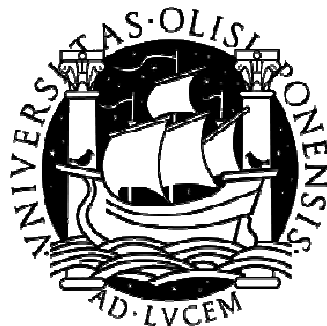


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo da atividade antimicrobacteriana e ativação
biológica de ésteres de ácidos orgânicos fracos.**

Marta Videira Magalhães

Dissertação
Mestrado em Bioquímica

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo da atividade antimicrobacteriana e
ativação biológica de ésteres de ácidos orgânicos
fracos.**

Marta Videira Magalhães

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Orientadores:

Professor Luís Filipe Vicente Constantino

Professora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro

2012

AGRADECIMENTOS

Embora a realização de uma tese seja um trabalho individual, muito deram o seu contributo de diversas maneiras, a estes expresso os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Luís Filipe Vicente Constantino por me ter permitido integrar no trabalho, pela sua orientação, apoio científico e pelas sugestões fornecidas ao longo do trabalho.

À Professora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro por ter aceitado ser a minha orientadora pela FCUL, pelo seu apoio, incentivo e disponibilidade.

À Professora Elsa Anes por ter cedido o laboratório do CPM-URIA para se efectuarem os estudos de atividade.

À Professora Emília Valente, pela amizade, carinho, apoio constante ao longo destes dois anos, pela paciência e por tudo o que me ensinou.

Aos membros do grupo da Professora Elsa Anes: Nuno Carmo, David Pires e Paulo Bettencourt, pelo apoio constante, sugestões, disponibilidade e por tudo o que me ensinaram sobre Microbiologia.

A todos os colegas do MedChem, que direta ou indiretamente tornaram possível este trabalho, especialmente à Ana Raquel Site, Rita Capela, Daniela Miranda, Fábio Santos, Teresa Almeida e Daniel Gonçalves.

Ao Sr Francisco Carvalho e à D. Lurdes Bilro, sem os quais os laboratórios de Química Farmacêutica não funcionavam.

À D. Lurdes e a D. São da microbiologia pela esterilização do material e pela prontidão em ajudarem-me em tudo o que precisasse.

Ao Mestre Mário Nunes do grupo da Química Física por ter cedido a microcentrífuga, o que permitiu a realização dos estudos em homogenato de micobactérias.

Aos SASUL, nomeadamente à Doutora Ana Cortes, pelo apoio financeiro nestes sete anos.

Ao Rafael Nunes, pelo apoio na síntese do 4-clorobenzoato de propilo, pela amizade e pela troca de conhecimentos.

Aos meus colegas do curso de Bioquímica, especialmente à Ália dos Santos, Inês Pereira, Rita Costa, Jailson Querido e Raquel Costa pelos seis anos de curso que passámos juntos, pelos bons e maus momentos, pela amizade, pelo apoio e paciência e pela troca de conhecimentos.

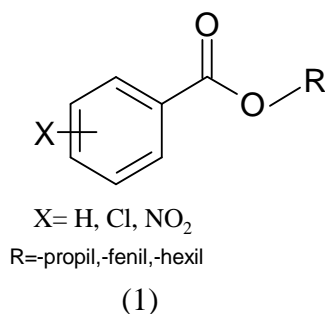
À minha querida amiga Soraia Rosa, pelo incentivo, apoio e empatia demonstrados e pelos bons conselhos.

Aos meus grandes amigos Filipe Lavrador e Diana Rafael, pelos passeios que demos por Portugal, pela amizade, por aturarem o meu humor e por termos partilhado juntos vitórias e derrotas.

E como os últimos são os primeiros: um grande agradecimento aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio financeiro e emocional que sempre me deram e por me terem incentivado a não desistir do curso, aos meus irmãos Élia e Samuel e ao José Carlos, pelo carinho, amizade, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem nos bons e maus momentos e pelos momentos divertidos que passamos juntos e ao meu Tio Abílio, por se preocupar sempre comigo, por me acreditar em mim e por ter sempre conselhos sábios para me dar.

Resumo

A tuberculose é uma das doenças mais prevalentes no mundo.⁽¹⁾ Nos últimos anos surgiram multirresistências aos fármacos usados no tratamento da tuberculose⁽²⁾ Surge a necessidade de desenvolver novos antimicobacterianos. Uma abordagem interessante consiste no uso de pró-fármacos de compostos que tenham demonstrado actividade mas tenham alguns problemas associados como por exemplo deficiente absorção ou entrada nas células de micobactérias. , Estudos anteriores demonstraram que alguns ácidos fracos apresentam uma atividade antimicobacteriana significativa contra o *M.tuberculosis*, resultado da sua acumulação na célula devido a um mecanismo de efluxo deficiente.^(3, 4)Essa atividade é maior a pH ácido⁽³⁻⁶⁾ Os ésteres são mais ativos que os ácidos, uma vez que se difundem ao longo da membrana, dentro da qual são convertidos em ácidos.⁽⁶⁾ Para serem efectivos os pró-fármacos necessitam ser resistentes à hidrólise no plasma, capazes de sofrer ativação pelas micobactérias,⁽⁶⁾ Foram estudados ésteres derivados do BA, com modificações na cadeia alcoólica, com cadeias propílicas, fenílicas e hexílicas, de modo a estudar o efeito da lipofilia na estabilidade e atividade destes., foram também introduzidos substituintes na porção acilo da molécula, para estudar o efeito do pKa na estabilidade e atividade destes pró-fármacos (1).

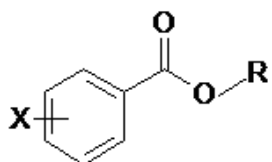


Os estudos de atividade foram monitorizados em três estirpes bacterianas: *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium tuberculosis* RA e a dois valores pH 6,5 e 5,9. Também foi estudada a hidrólise química em tampão fosfato 7,4 e tampão 5,9, bem como a hidrólise enzimática em plasma humano e ainda ativação dos pró-fármacos pelas micobactérias. Os compostos estudados demonstraram ser estáveis em plasma humano e suficientemente ativados pelas micobactérias. Também demonstraram atividade significativa contra o *M.tuberculosis* sendo os compostos mais interessantes os derivados do ácido 3,5-dinitrobenóico Com base nestes estudos, pretende-se aumentar a série de ésteres estudados, de modo a desenvolver potenciais pró-fármacos eficazes no tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose, pró-fármaco, atividade, lipofilia, pK_a

Abstract

Tuberculosis is one of the most prevalent diseases in the world.⁽¹⁾ However, in the past few years, resistances to this antimicrobial drug have emerged.⁽²⁾ One interesting approach is the use of prodrugs that have showed some significant activity but have some problems relate to a poor absorption and difficulty to pass over membranes. Previous studies have showed that weak acids demonstrated significant antimycobacterial activity, probably as a result of accumulation inside the cell, due to a deficient efflux mechanism.^(3, 4) This antimicrobial activity increases at acidic pH.⁽³⁻⁶⁾ Esters are more active than acids, suggesting that these compounds diffuse over the membrane layer into the cell, where they are converted to acids⁽⁶⁾ To be effective they must be resistant to hydrolysis in human plasma and be activated in mycobacteria.⁽⁶⁾ We studied BA esters with electron withdrawing groups on the acyloxy portion of the molecule, in order to assess effect of the pK_a of the acyloxy portion on the activity of those derivatives. Modifications have been done also within the alkyl portion of the ester molecule, with propyl, phenyl and hexyl alcoxyl chains, in order to study the effect of the lipophily in the activity of those derivatives. The activity was assayed against three mycobacterium species: *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* at two different media pH values: pH 6,5 and pH 5,9.



X= H, Cl, NO₂

R=propyl, phenyl and hexyl

(1)

The chemical stability has been studied in phosphate buffer pH 7.4, enzymatic stability in human plasma and the activation was evaluated using a *M. smegmatis* homogenate. We observed that most of the compounds show high stability in human plasma and fast hydrolysis in mycobacteria homogenate. Future development of new anti-tuberculosis drugs will take in account the observed conclusions.

Key words: tuberculosis, prodrug, activity, lipophily, pK_a

Glossário

TB-Tuberculose	AINE-anti-inflamatório não esteróide
TB.-MDR-Tuberculose Multi-Resistente	SA- ácido salicílico
VIH- Virus da imunodeficiência humana	ASA- ácido acetilsalicílico
NTM- Micobactérias Não Tuberculosas	NA-ácido nicotínico
MTC—Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	INA-ácido isonicotínico
BCG- <i>Bacille Calmette Guérin</i>	UV-ultravioleta
MAPc- Complexo micólicoarabinogalactano peptidoglicano	THF-tetrahidrofurano
IFN- γ - Interferão gama	1H -RMN- espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
ROS- Espécies reativas de oxigênio	^{13}C -RMN- espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RNI - Intermediários reativos de azoto	J-constante de acoplamento
AG-ácidos gordos	IV-Jnfra-vermelho
DNA- ácido desoxiribonucleico	η - rendimento
IZH-isoniazida	HPLC- cromatografia líquida de alta pressão
RFP-rifampicina	ACN -acetonitrilo
PZA- pirazinamida	I-força iônica
POA-ácido pirazínico	C _T - concentração total
PncA-pirazinamidas	CMI- concentração mínima inibitória
APAS- ácido para-aminosalicílico	UFC-unidades formadoras de colônia
FAS-I -ácidos gordos sintase I	OADC-ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catálase.
FAS-II-ácidos gordos sintase II	DO-densidade óptica
HPOA- ácido pirazínico protonado	DMSO- dimetilsulfóxido
POA- ácido pirazínico	PBS- tampão fosfato
BA- ácido benzóico	k_{obs} -constante de <i>pseudo</i> -primeira ordem
PON1- paraoxonase-1	$t_{1/2}$ -tempo de semi-vida
PON2-paraoxonase-2	<i>P</i> - coeficiente de partição
PON3-paraoxonase-3	p <i>K</i> _a –constante de acidez
ASH- albumina sérica humana	REA- relações estrutura-atividade
Ser-serina	σ_H - constante de Hammett
Tyr- tirosina	σ^* -parâmetro de polaridade de Taft
Trp-triptofano	E _s - parâmetro estereoquímico de Taft
Asp- Aspartato	E _s v parâmetro estereoquímico de Charton
Glu-glutamato	

ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO	21
1.1-A tuberculose	23
1.2 - Micobactérias.....	24
1.2.1 - Diferentes tipos de micobactérias	24
1.2.2 - Estrutura da parede celular e permeabilidade a fármacos.....	25
1.3 - Caracterização da doença.....	27
1.3.1 - Tratamento da tuberculose	29
1.3.1.1 - Quimioterapia	29
1.3.2.1.1 - Fármacos de 1ª linha	29
1.3.2.2.2 - Fármacos de 2ª linha	32
1.3.2.2.3 - Efeito do pH na susceptibilidade a pró-fármacos	35
1.4- Pró-fármacos.....	37
1.4.1- Ésteres como pró-fármacos	38
1.4.2 - Hidrólise química.....	39
1.4.3- Hidrólise enzimática	40
1.5 -Esterases	41
1.5.1- Esterases no plasma humano.....	43
1.5.2 - Esterases de micobactérias.....	44
1.6 - Ácidos fracos com ação antimicobacteriana	46
1.7 - Pró-fármacos derivados de ácidos fracos.....	48
1.8 - Objetivo do trabalho	49
2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
2.1 - Equipamento e material.....	55
2.2 - Reagentes e solventes.....	56
2.3 - Síntese de derivados do ácido benzóico	57
2.4 - Estudos de estabilidade dos ésteres derivados do ácido benzóico.....	58
2.4.1 - Estudos de estabilidade em tampão fosfato	61

2.4.2 - Estudos de estabilidade em plasma humano	62
2.4.2.1 - Obtenção do plasma humano	62
2.4.2.2 - Estabilidade em plasma humano.....	62
2.4.3 - Hidrólise em homogenato de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	63
2.4.3.1 - Preparação do homogenato de <i>M. smegmatis</i>	63
2.4.3.2 - Estabilidade em homogenato de micobactérias	64
2.5 - Estudos de atividade dos ésteres derivados do ácido benzóico.....	64
2.5.1- Estirpes bacterianas.....	64
2.5.2 - Preparação dos meios de cultura.....	65
2.5.3 - Preparação das culturas de bactérias	65
2.5.4 - Preparação dos inóculos para os estudos de atividade.....	67
2.5.4.1 - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	67
3 – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E ATIVIDADE.....	69
3.1- Estudos de estabilidade	73
3.1.1 - Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em meio químico - tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9.	73
3.1.2 Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em meios biológicos	77
3.1.2.1 Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em plasma humano....	78
3.1.2.2 - Estudo da ativação dos ésteres derivados do ácido benzóico em homogenato de micobactérias.....	89
3.1.3 - Conclusão.....	98
3.2 - Estudo da atividade antimicobacteriana dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico.....	105
3.2.1 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em <i>M. smegmatis</i>	106
3.2.2 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em <i>M. bovis</i> BCG:.....	110
3.2.3 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em <i>M. tuberculosis</i> Ra.	114
3.2.4 Conclusão.....	116
4.1. - Efeito da estrutura dos derivados do ácido benzóico na estabilidade nos ensaios em meio biológico.....	122
4.1.1 - Estudos de estabilidade em plasma.....	123

4.2 - Efeito da estrutura dos derivados do ácido benzóico nas atividades com as diferentes estirpes micobacterianas ensaiadas.....	128
4.2.1. - Estudos de atividade em <i>M. smegmatis</i>	129
4.2.1.1 - Estudos de atividade em <i>M. smegmatis</i> a pH = 6,5	130
4.2.1.2 - Estudos de atividade em <i>M. smegmatis</i> a pH = 5,9	132
4.2.2. - Estudos de atividade em <i>M. bovis</i> BCG:.....	134
4.2.2.1 - Estudos de atividade em <i>M. bovis</i> a pH = 6,5	135
4.2.2.2 - Estudos de atividade em <i>M. bovis</i> a pH = 5,9	137
4.3. - Estudos de atividade em <i>M. tuberculosis</i> Ra:	139
4.3.1 - Estudos de atividade em <i>M. tuberculosis</i> Ra a pH = 6,5.....	140
5.CONCLUSÃO	147
6.BIBLIOGRAFIA	151
7.ANEXOS	159
Anexo I-Cálculos para a preparação das soluções de tampão fosfato de pH =7,4 e pH = 5,9 com concentração total 0,05M e força iônica 0,15M.	161
Anexo II- Curvas de calibração	163
Anexo III-Estabilidade dos ácidos benzóico, 3,5-dinitro-benzóico e 2,6-diclorobenzóico em tampão fosfato 7,4.....	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Taxas de incidência de tuberculose estimadas, por país em 2010	23
Figura 1.2 - Representação esquemática do envelope celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
Figura 1.3 - Diferentes respostas após a infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e respectiva resposta imune.....	28
Figura 1.4 - Representação das estruturas da pirazinamida(a), isoniazida (b) e rifampicina (b).....	30
Figura 1.5 - Estruturas do ácido pirazinóico (a), e do ácido nicotínico (b).	30
Figura 1.6 - Conversão da pirazinamida na sua forma ativa (ácido pirazinóico) pelo enzima pirazinamidase (pncA).....	31
Figura 1.7 - Representação da estrutura química do etambutol.....	32
Figura 1.8 - Representação das estruturas da estreptomicina(a) e canamicina, amicacina (b)	32
Figura 1.9 - Representação das estruturas químicas da ciprofloxacina(a); moxifloxacina (b), oxofloxacina e levofloxacina (c); gatifloxacina (d)	33
Figura 1.10 - Representação das estruturas químicas da etionamida(a); cicloserina (b); ácido para-acetilsalicílico (c) e ácido benzóico (d).....	34
Figura 1.11 - Mecanismo de acção proposto para a pirazinamida e para outros derivados de ácidos fracos.	36
Figura 1.12 - Esquema geral da hidrólise química de ésteres e amidas derivados de ácidos carboxílicos, via catálise ácida (a) e catálise básica (b).	40
Figura 1.13 - Estrutura da tríada catalítica das hidrolases, na hidrólise de derivados ácidos carboxílicos.	41
Figura 1.14 - Diagrama topológico do fold mínimo das α/β hidrolases com a tríada catalítica demarcada a vermelho(a) tríada catalítica das α/β hidrolases na carboxilesterase do <i>Pseudomonas fluorescens</i> (b).....	42
Figura 1.15 - Representação da estrutura da LipC (Rv0220).	46
Figura 1.16 - Representação da estrutura da molécula de ácido benzóico e respectivos substituintes na porção aciloxílica (X) e na porção alcóxilo (R).....	50
Figura 2.1 - Cromatograma obtido por HPLC com o eluente 60%/40% Acetonitrilo/Fase aquosa com fluxo 1,0mL/min e detecção a 230nm. No início da hidrólise (a) e após a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (b). Tempo de retenção do éster: 5,10 min. Tempo de retenção do ácido: 2,80 min	61
Figura 3.1.1 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato pH 7,4 para o composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dCIBH).	76
Figura 3.1.2 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato pH 5,9 para o composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dCIBH).	77
Figura 3.1.3 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de propilo (BP) em plasma humano.....	78
Figura 3.1.4 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de fenilo (BF) em plasma humano.	79
Figura 3.1.5 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de hexilo (BH) em plasma humano.....	79
Figura 3.1.6 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP) em plasma humano.	80
Figura 3.1.7 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF) em plasma humano.	80
Figura 3.1.8 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH) em plasma humano.	81
Figura 3.1.9 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de propilo (4CIBP) em plasma humano.	81
Figura 3.1.10 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de fenilo (4CIBF) em plasma humano.....	82
Figura 3.1.11 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de hexilo (4CIBH) em plasma humano.	82
Figura 3.1.12 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de propilo (4NBP) em plasma humano.	83
Figura 3.1.13 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF) em plasma humano.	83

Figura 3.1.14 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de hexilo (4NBH) em plasma humano.....	84
Figura 3.1.15 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dCIBP) em plasma humano.	84
Figura 3.1.16 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dCIBH) em plasma humano.	85
Figura 3.1.17 - Representação do efeito indutivo nos grupos cloro na posição 4 e nas posições 2,6 da porção aciloxílica no anel aromático (a) e do efeito de ressonância do grupo cloro na posição 4 no anel aromático (b).	88
Figura 3.1.18 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de propilo (BP) em homogenato de micobactérias.	90
Figura 3.1.19 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de fenilo (BF) em homogenato de micobactérias.	90
Figura 3.1.20 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de hexilo (BH) em homogenato de micobactérias.	91
Figura 3.1.21 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP) em homogenato de micobactérias.	91
Figura 3.1.22 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF) em homogenato de micobactérias.....	92
Figura 3.1.23 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH) em homogenato de micobactérias.	92
Figura 3.1.24 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-clorobenzoato de propilo (4CIBP) em homogenato de micobactérias.....	93
Figura 3.1.25 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-clorobenzoato de fenilo (4CIBF) em homogenato de micobactérias.	93
Figura 3.1.26 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de propilo (4NBP) em homogenato de micobactérias.	94
Figura 3.1.27 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF) em homogenato de micobactérias.....	94
Figura 3.1.28 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de hexilo (4NBH) em homogenato de micobactérias.	95
Figura 3.1.29 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dCIBP) em homogenato de micobactérias.....	95
Figura 3.1.30 - Representação do efeito de ressonância nos grupos nitro nas posições 3,5 (a) e na posição 4 (b) da porção aciloxílica no anel aromático.....	100
Figura 3.2.1 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em <i>M. smegmatis</i> a pH 6,5.	107
Figura 3.2.2 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em <i>M. smegmatis</i> a pH 5,9.....	108
Figura 3.2.3 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em <i>Mycobacterium bovis</i> BCG a pH 6,5.....	111
Figura 3.2.4 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em <i>Mycobacterium bovis</i> BCG a pH 5,9.....	112
Figura 3.2.5 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH, 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH em <i>M. tuberculosis</i> a pH 6,5	114
Figura 4.1 - Relação entre o valor de $\log k_{obs}$ em plasma humano e a lipofilia, $\log P$	124
Figura 4.2 - Relação entre o valor de $\log k_{obs}$ em plasma humano e o pK_a	124
Figura 4.3 - Relação entre o valor de $\log k_{obs}$ em homogenato de <i>M. smegmatis</i> e a lipofilia, $\log P$	126
Figura 4.4 - Relação entre o valor de $\log k_{obs}$ no homogenato de micobactérias e o pK_{aac}	127
Figura 4.5 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. smegmatis</i> a pH 6,5 e a lipofilia $\log P$	130
Figura 4.6 - Relação entre pCMI para as atividades em <i>M. smegmatis</i> a pH 6,5 e pK_{aac}	131
Figura 4.7 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. smegmatis</i> a pH 5,9 e $\log P$	132
Figura 4.8 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. smegmatis</i> a pH 5,9 e o pK_{aac}	132
Figura 4.9 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. bovis</i> BCG a pH 6,5 e a lipofilia, $\log P$	135
Figura 4.10 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. bovis</i> BCG a pH 6,5 e o pK_{aac}	135
Figura 4.11 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. bovis</i> BCG a pH 5,9 e a lipofilia, $\log P$	137

Figura 4.12 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. bovis</i> BCG a pH 5,9 e o pK_{aac}	137
Figura 4.13 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. tuberculosis</i> H37Ra a pH 6,5 e a lipofilia, log <i>P</i> . .	140
Figura 4.14 - Relação entre o valor de pCMI em <i>M. tuberculosis</i> H37Ra a pH 6,5 e pK_{aac}	140
Figura A II.1 - Reta de calibração do 4-nitrobenzoato de fenilo no eluente 60% ACN/ 40% Fase aquosa.	163
Figura A II.2 - Injeção da concentração 5×10^{-6} M do composto 4-nitrobenzoato de fenilo.....	163
Figura A.III.1 - Estabilidade dos ácidos benzóico (a), 3,5-dinitrobenzóico (b) e 2,6-diclorobenzóico (c) em tampão fosfato pH=7,4 (Ct=0,05M, I=0,15M). Os ensaios foram realizados em triplicado a T=37°C, com 2% acetonitrilo e com Ci= 5×10^{-4} M.	164
Figura A.IV.1 .- Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato para o composto benzoato de fenilo (BF) em tampão fosfato pH 7.4 (a), pH 5,9 (b); e para os compostos benzoato de hexilo(BH) (c), 3,5-dinitrobenzoato de fenilo(35dNBF) (d), 3,5-dinitrobenzoato de hexilo(35dNBH) (e) e 2,6-diclorobenzoato de propilo(26dClBP)(f) em tampão fosfato pH 7,4.	165

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1- Fármacos usados na tuberculose e respetivos mecanismos de atuação.	35
Tabela 2.1- Tempos de retenção obtidos pelo método de HPLC para os derivados do ácido benzóico de acordo com o eluente utilizado.	59
Tabela 3.1.1- Constantes de <i>pseudo</i> -primeira ordem e tempos de semi-vida para as hidrólises dos ésteres derivados do ácido benzóico em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9 ($C_t = 0,05M$ e $I=0,15M$). ⁴ M.	Erro!
Marcador não definido.	
Tabela 3.1.2- Constantes de <i>pseudo</i> -primeira ordem e tempos de semi-vida para as hidrólises dos ésteres derivados do ácido benzóico em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9 ($C_t = 0,05M$ e $I=0,15M$). Erro!	
Marcador não definido.	
Tabela 3.1.3- Hidrólise dos ésteres derivados do ácido benzóico em plasma humano a 80% em tampão fosfato pH = 7,4.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3.1.4- Hidrólise dos ésteres derivados do ácido benzóico em homogenato de micobactérias a 2% em tampão fosfato 7.4 ($C_t=0,05M$, $I=0,15M$).	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3.1.5 - Efeito do substituinte na porção aciloxílica dos ésteres derivados do ácido benzóico (com o mesmo grupo alcóxilo) nas constantes de <i>pseudo</i> -primeira ordem para as hidrólises em plasma a 80% e em homogenato de micobactérias a 2% em tampão fosfato a pH = 7,4 ($C_t=0,05M$, $I=0,15M$) com 2% de acetonitrilo e à temperatura de 37°C. (Concentração inicial de substrato $C_i=5 \times 10^{-4}M$).Erro! Marcador não definido.	
Tabela 3.2.1- Valores de CMI e respetiva percentagem de células para o <i>Mycobacterium smegmatis</i> pH 6,5 e 5,9.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3.2.2- Valores de CMI e respetiva percentagem de células para o <i>Mycobacterium bovis</i> a pH 6,5 e 5,9.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3.2.3 -Valores de CMI e respetiva percentagem de células para o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pH 6,5.	Erro! Marcador não definido.
Tabela 4.1- Valores dos diferentes descritores para os ésteres derivados do ácido benzóico.	121

1-INTRODUÇÃO

1.Introdução Teórica

1.1-A tuberculose

A tuberculose continua a ser um das doenças mais prevalentes no mundo. Em 2010, em todo mundo morreram 1,4 milhões de pessoas. Apesar da sua taxa incidência ter sofrido um declínio desde 1990, esta continua a ser bastante elevada. Estima-se que em 2010, tenham ocorrido 8,8 milhões de novos casos, dos quais cerca de 0,35 milhões estavam associados ao vírus da imunodeficiência humana (VIH) positivo. Além disso, estima-se que nesse mesmo ano, 650.000 dos casos estariam associados à tuberculose multi-resistente (TB-MDR). A prevalência da tuberculose em 2010 era de 12.000 milhões de casos, em todo o mundo, o que equivale a 178 casos por cada 100 000 habitantes. ⁽¹⁾ -Figura 1.1

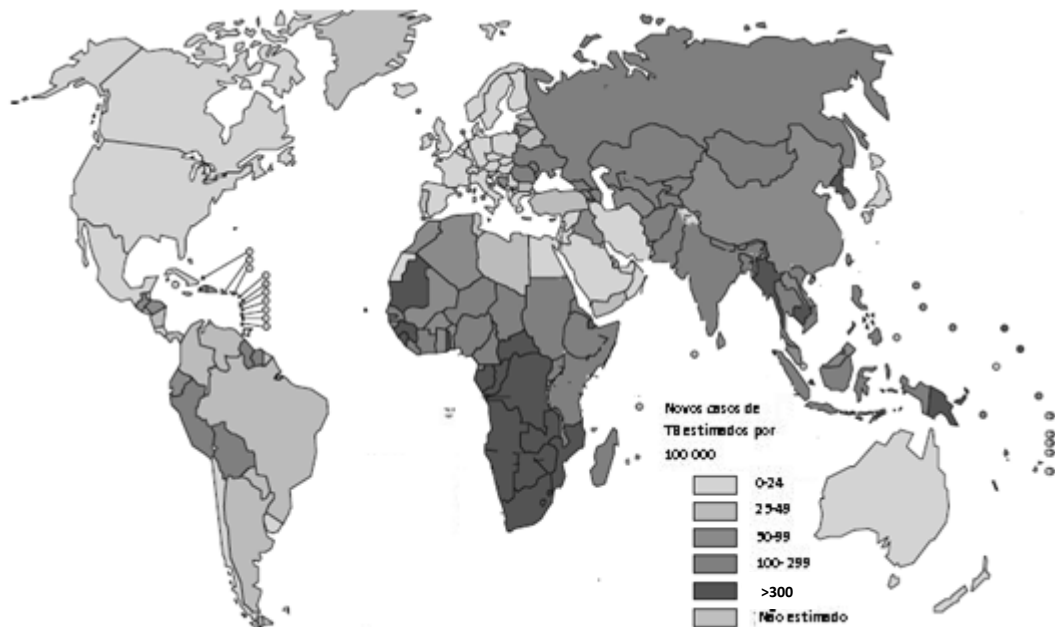


Figura 1.1 - Taxas de incidência de tuberculose estimadas, por país em 2010 ⁽¹⁾.

A tuberculose é provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo pertencente ao género *Mycobacterium*. As micobactérias pertencem ao grupo das bactérias ácido-álcool resistentes.⁽⁷⁾ Estas bactérias possuem entre outras características: serem aeróbias obrigatórias, desprovidas de motilidade e não conterem cápsula.⁽⁸⁾

1.2 - Micobactérias

1.2.1 - Diferentes tipos de micobactérias

As micobactérias são responsáveis por várias doenças, como a lepra e a tuberculose. A sua classificação taxonómica é:

Reino: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Classe: Actinobacteria

Sub-classe: Actinobacteridae

Ordem: Actinomycetales

Sub-ordem: Cornebacterineae

Família: Mycobacteriaceae

Genéro: *Mycobacterium*⁽⁹⁾

As micobactérias incluem duas categorias: micobactérias não tuberculosas (NTM) e o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). A categoria das micobactérias não tuberculosas (NTM) engloba todas as micobactérias que podem causar determinadas doenças, mas não a tuberculose. Neste grupo é enquadrado o *Mycobacterium smegmatis*.^(10, 11) Por outro lado, as micobactérias pertencentes ao MTC são as que transmitem a doença da tuberculose. Este grupo inclui o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*.⁽¹²⁾ Além desta distinção, também se utiliza outra classificação baseada na velocidade de crescimento das bactérias. Assim estas podem ser classificadas em bactérias de crescimento rápido (*Mycobacterium smegmatis*) e bactérias de crescimento lento (*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*).⁽⁷⁾

O *Mycobacterium smegmatis* pode ser encontrado principalmente no solo, água e plantas.⁽¹³⁾ Em termos metabólicos, o *Mycobacterium smegmatis* é um organismo aeróbio, que realiza a fosforilação oxidativa, de modo a obter a energia necessária para o seu crescimento. Este microorganismo é ainda quimiolitotrófico, utilizando compostos inorgânicos como o monóxido de carbono do solo, como fonte de carbono e energia.⁽¹⁴⁾

Esta micobactéria é frequentemente usada como modelo para o estudo da tuberculose, visto ser uma bactéria de crescimento rápido, não entrar em células epiteliais e não ser patogénica.⁽¹⁵⁾ O *Mycobacterium bovis* é uma bactéria aeróbia, de crescimento lento e que causa a tuberculose em gado.⁽¹⁶⁾ Esta micobactéria é semelhante ao *Mycobacterium tuberculosis*, no que diz respeito ao metabolismo e estrutura celular.⁽¹⁷⁾

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria patogénica que causa a tuberculose em humanos. Esta micobactéria é aeróbia e necessita de elevados níveis de oxigénio para sobreviver.⁽⁷⁾ A sua parede celular possui uma estrutura típica, semelhante à das outras micobactérias, além disso possui proteínas membranares com estrutura semelhante a poros, denominadas porinas, importantes para a passagem de substâncias para o seu interior.⁽¹⁸⁾

1.2.2 - Estrutura da parede celular e permeabilidade a fármacos.

Conforme já referido, as micobactérias possuem uma parede celular com característica bastante particular, que influencia directamente a permeabilidade a alguns fármacos. Em termos estruturais, as micobactérias possuem uma membrana celular interna e uma parede celular fina e hidrófoba, rica em ácidos micólicos e em ácidos gordos ramificados, o que é característico das bactérias ácido-álcool resistente.⁽¹⁵⁾ A permeabilidade da membrana externa difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A membrana externa das bactérias Gram-negativas é impermeável a pequenas moléculas hidrofílicas e a grandes moléculas. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas possuem uma membrana extremamente permeável a antimicrobianos, devido ao seu elevado conteúdo lipídico.⁽¹⁹⁾ Embora as micobactérias não pertençam a nenhum destes dois grupos, a estrutura da sua parede celular é semelhante à das bactérias gram-negativas.⁽¹⁹⁾

As micobactérias possuem uma parede celular única, com grande complexidade e hidrofobicidade, o que contribui para a resistência e reduzida permeabilidade a determinados fármacos.⁽²⁰⁻²²⁾ O envelope celular é constituído pela membrana plasmática (zona mais interna), parede celular e lípidos estraíveis como glicanos, lípidos e proteínas. A zona exterior da membrana plasmática é constituída por peptidoglicanos

ligados covalentemente ao arabinogalactano por uma ponte fosfodiéster, cuja extremidade se encontra ligada aos ácidos micólicos, formando-se um complexo denominado micolil-arabinogalactano peptidoglicano (MAPc) - Figura 1.2.⁽²²⁻²⁶⁾

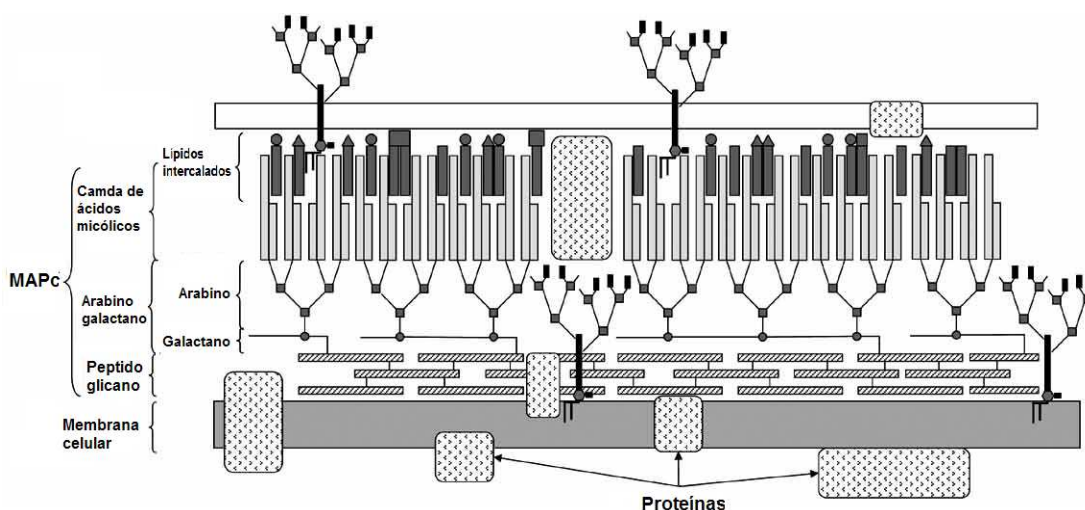


Figura 1.2- Representação esquemática do envelope celular do *Mycobacterium tuberculosis*.⁽²⁵⁾

Ao contrário do que acontece com os lípidos, e outros componentes da membrana que solubilizam, este complexo permanece insolúvel quando ocorre rutura da membrana, o que contribui para a sua hidrofobicidade e para a viabilidade celular.⁽²⁶⁾

Os ácidos micólicos são de grande importância na estrutura e manutenção da parede celular, visto que constituem a zona interna da bicamada lipídica e possuem baixa fluidez, que contribui para a baixa permeabilidade da parede celular microbiana e para a sua resistência natural a fármacos. Micobactérias, como a estirpe wt (*M.smegmatis* mc² 155), possuem por natureza uma fraca permeabilidade, uma vez que sintetizam ácidos micólicos de cadeia longa, o que leva à formação de compostos denominados β -hidroximeromicolatos, que se encontram covalentemente ligados aos ácidos gordos (AG) e que levam à formação de uma estrutura altamente organizada.⁽²³⁾

O elevado conteúdo lipídico da parede celular micobacteriana constitui uma barreira na difusão dos antimicobianos. Por exemplo, a natureza hidrofóbica da parede celular e a sua constituição em ácidos micólicos e glicolípidos de cadeia longa permite que fármacos hidrófobos se difundam ativamente. No entanto, o mesmo não acontece com os antimicrobianos hidrofílicos, que para atravessar a membrana necessitam do transporte assistido por porinas.⁽²³⁾ As porinas podem ser definidas como canais proteicos que predominam na parede das micobactérias e que são responsáveis pelo

influxo de solutos hidrofílicos, e antibióticos a uma baixa velocidade de absorção.^(23, 27) Além disso, de permitir a passagem de substâncias, a existência de porinas também influencia o crescimento micobacteriano e a resistência a fármacos. Deste modo, por vezes, o crescimento micobacteriano é perturbado devido à passagem lenta de solutos hidrofóbicos por difusão passiva.⁽²⁷⁾

Outro fator importante que condiciona a entrada de molécula pelas porinas é a lipofilia. De facto, moléculas mais lipofílicas passam mais devagar pelas porinas, tendo mais tendência de entrada pela parede celular por difusão direta. Isto acontece devido às diferentes orientações da esfera de hidratação em torno do canal proteico, que depende da presença de aminoácidos existentes em lados opostos da parede do canal.^(28, 29)

Neste momento são conhecidas algumas porinas que predominam na parede micobacteriana. Por exemplo, no *M. smegmatis*, a porina mais abundante é a MspA, esta não está presente nem na BCG nem no *M. tuberculosis*. No entanto, o seu papel ficou evidente num estudo recente que mostrou que uma deleção nesta porina reduz a taxa de crescimento, indicando que o influxo de nutrientes através da porinas é necessário para o seu crescimento normal.^(30, 31)

1.3 - Caracterização da doença

A infeção por tuberculose inicia-se quando o bacilo da tuberculose entra no organismo, através da via respiratória, espalhando-se depois para outros tecidos pelos vasos sanguíneos e linfáticos. A principal via de transmissão é a via aérea, podendo esta ocorrer de várias formas: tosse, espirros, expetoração, sendo a tosse a principal. Através da tosse, ocorre a produção de aerossóis, pequenas gotículas infecciosas de 1-5 µm, que permanecem no ar durante muito tempo, podendo ser inaladas por outros indivíduos.⁽³²⁾

A inalação dos bacilos da tuberculose pode ter três consequências diferentes. A primeira consiste no reconhecimento imediato dos bacilos pelo sistema imune, levando a uma posterior erradicação destes. Uma segunda consequência pode ser a evolução da infeção para tuberculose, sendo esta a mais frequente. Outra hipótese é a infeção não evoluir para tuberculose, devido à retenção da micobactéria no granuloma, estrutura que contém centros necrosos de aspeto caseoso, que contém macrófagos e linfócitos e dentro do qual os bacilos ficam retidos na forma latente.^(32, 33) Estes podem permanecer

aí para sempre, serem reativados ou podem ser expelidos para as vias pulmonares.⁽³⁴⁾ Isto ocorre quando há caseificação da lesão, levando à libertação dos bacilos e consequentemente disseminação e transmissão.⁽³²⁾

Esta transmissão irá activar a produção de interferão-gama ($\text{IFN-}\gamma$), que irá ativar os macrófagos e enviar um sinal de recrutamento para o local da infecção. De seguida, ocorrerá a maturação do fagossoma, estrutura celular dentro da qual se encontram as bactérias fagocitadas, que possui no seu interior enzimas hidrolíticas.^(32, 33) Após a maturação, ocorre a fusão desta estrutura com o lisossoma, formando o fagolisossoma, que possui no seu interior um ambiente bastante ácido e um grande número de hidrolases, cuja combinação resulta na morte e na digestão das bactérias.^(35, 36) No entanto, o *Mycobacterium tuberculosis* consegue evadir-se deste mecanismo, inibindo esta fusão, podendo permanecer dentro do fagossoma num estado de dormência até possuir condições para ser novamente reactivado (Figura 1.3). Na maioria dos casos, a doença permanece latente durante anos, podendo-se manifestar em situações de imunossupressão, nomeadamente nos casos de infeção com VIH.⁽³³⁾

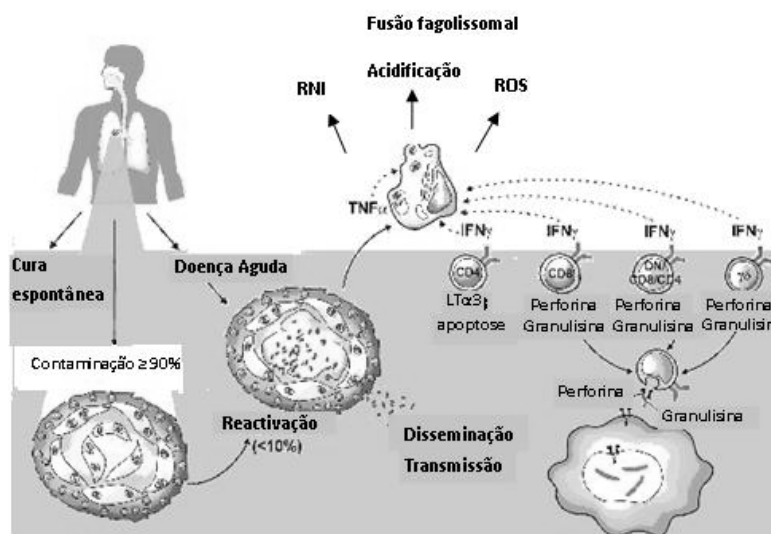


Figura 1.3- Diferentes respostas após a infeção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e respectiva resposta imune
(33)

1.3.1 - Tratamento da tuberculose

O tratamento para a tuberculose baseia-se na administração da vacina BCG, efetuada em recém-nascidos, como forma de prevenção e na administração de fármacos antimicobacterianos, caso o indivíduo esteja em contacto com a doença e passe então da sua forma latente à sua forma ativa. O *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guérin (BCG) deriva do *Mycobacterium bovis* a partir de uma mutação espontânea, correspondendo a uma estirpe atenuada da bactéria. A vacina da BCG é eficaz como forma de prevenção, no entanto não permite o reforço do sistema imune durante a adolescência, nem tão pouco protege da sua forma mais ativa, a tuberculose pulmonar. As estatísticas apontam para apenas 50% de eficiência desta vacina na proteção contra a doença.^(37, 38)

Neste momento, estão a ser estudadas potenciais vacinas, tendo sido investigados novos possíveis alvos para vacinas, mas até ao momento ainda não surgiu nenhuma vacina para substituir a atual. Enquanto isso, o tratamento recorrente baseia-se na administração de fármacos.

1.3.1.1 - Quimioterapia

1.3.2.1.1 - Fármacos de 1ª linha

Durante muito tempo, o fármaco de 1ª linha mais utilizado no tratamento foi a estreptomicina, no entanto, o seu uso primordial foi abandonado, porque se desenvolveu resistência a este fármaco. Esta resistência pode ser natural, uma vez que a parede celular das micobactérias apresenta natureza hidrofóbica e reduzida permeabilidade a alguns fármacos. Mas a resistência aos antimicobacterianos está normalmente associada a mutações de genes que codificam para enzimas ativantes de um determinado fármaco. Deste modo, surge a necessidade de uma terapia combinada com vários tipos de fármacos.⁽²¹⁾ Para serem bem-sucedidos, estes fármacos devem possuir três características principais: atividade bactericida, atividade esterilizante e capacidade de evitar a resistência.⁽³⁹⁾ Geralmente, para aumentar a eficiência do tratamento são administrados três ou mais fármacos em simultâneo. Os três antimicobacterianos de 1ª linha mais utilizados na terapia combinada são: a pirazinamida (PZA) (Figura 1.4a)

(durante dois meses), isoniazida e rifampicina (seis meses seguintes até completar o tratamento) (Figura 1.4).^(2, 20, 21)

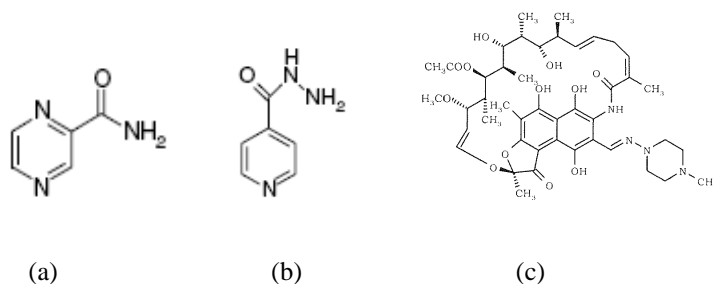


Figura 1.4- Representação das estruturas da pirazinamida(a), isoniazida (b) e rifampicina (b) ^(19, 40)

A isoniazida (INH) (Figura 1.4b) é um pró-fármaco que possui na sua estrutura um anel piridina e um grupo hidrazina, intervém em reações de oxidação e acetilação de grupos proteicos e pode ser ativado pelo KatG, enzima com atividade de peroxidase e de catalase. O seu mecanismo de ação está associado com a produção de radicais livres que inibem a produção do ácido micólico (componente essencial da parede celular bacteriana), o que leva a alterações no DNA e consequente morte bacteriana.^(2, 20, 21)

Outro antibiótico importante é a rifampicina (RFP). (Figura 1.4c) Este fármaco possui atividade bactericida e inibe a polimerase de RNA, bloqueando a transcrição, impedindo a síntese de mRNA e de proteína, provocando assim a morte do bacilo.^(2, 21) Também possui atividade esterilizadora na fase latente, tanto ao nível dos centros necróticos como no interior dos macrófagos.⁽²¹⁾ A introdução deste fármaco na terapia tem se mostrado eficaz, uma vez que este atua tanto em bacilos com metabolismo rápido como lento^(2, 20, 21, 41, 42). No entanto, existe enorme resistência a este fármaco, o que é uma das maiores causas de falha do tratamento.^(2, 20)

A pirazinamida (PZA) (Figura 1.4a) é um pró-fármaco do ácido pirazinóico (POA)(Figura 1.5a), análogo estrutural do ácido nicotínico(Figura 1.5b):

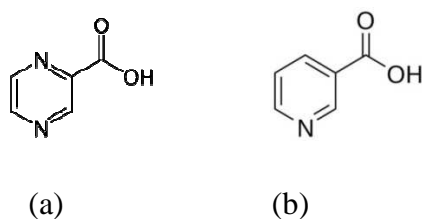


Figura 1.5 - Estruturas do ácido pirazinóico (a), e do ácido nicotínico (b).

Este fármaco possui efeito bactericida, atuando em meio ácido em macrófagos e em locais de inflamação aguda,⁽⁴³⁾ uma vez que entra na célula sobre a forma protonada, aumenta o número de prótons no interior da célula, levando à acidificação do citoplasma e ao colapso da força motriz protônica.⁽⁴⁴⁾ Esta acidificação é especialmente importante no controlo da infeção, uma vez que as bactérias fagocitadas pelos macrófagos são inibidas pelo pH ácido existente no interior dos fagolisossomas.⁽⁴³⁾

A ativação da pirazinamida em ácido pirazinóico ocorre por ação de um enzima micobacteriano - pirazinamidase (Figura 1.6).

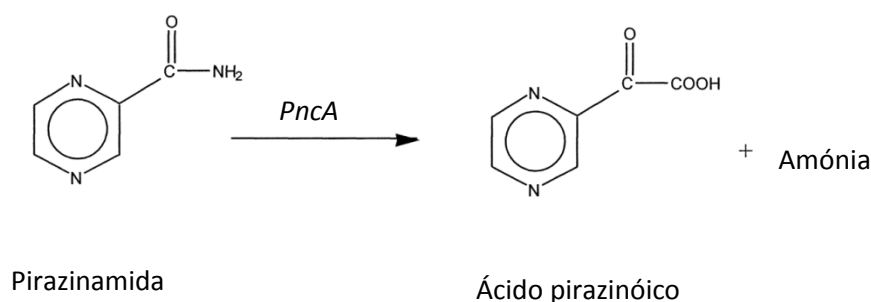


Figura 1.6 - Conversão da pirazinamida na sua forma ativa (ácido pirazinóico) pelo enzima pirazinamidase (pncA).⁽⁴⁰⁾

Embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja plenamente esclarecido, pensa-se que a pirazinamida entra na micobactéria por difusão passiva, convertendo-se em ácido pirazinóico, o que leva à sua acumulação no interior da bactéria.^(43, 45) As altas concentrações de ácido pirazinóico levam a uma diminuição do pH intracelular, o que provoca a inibição de enzimas importantes, como o ácido gordo sintase I (FAS I), enzima responsável pela ativação de precursores importantes na síntese dos ácidos micólicos pelo ácido gordo sintase II (FAS II), o que consequentemente leva ao bloqueio da biossíntese do ácido micólico.^(43, 46) A introdução da pirazinamida na terapia combinada com IZH e com RFP, provoca a redução da duração do tratamento para seis meses, uma vez que esta atua ao nível de bacilos persistentes em estado não replicativo, que crescem em ambiente ácido, no qual a maioria dos antimicobianos se encontra inativo.^(2, 45)

O etambutol (EMB) é outro fármaco usado na terapia combinada, devido à sua potente atividade bacteriostática - Figura 1.7. Este também intervém ao nível da parede celular da micobactéria, inibindo o enzima arabinosiltransferase, que catalisa a reação de polimerização da arabinose em arabinogalactano, principal polissacárido da parede celular da micobactéria.⁽²⁾

(MFX) e gatifloxacina (GFX) e, na sequência, levofloxacina (LFX), ofloxacina (OFX) e ciprofloxacina (CIP)- Figura 1.9. Quanto ao seu mecanismo de ação, as flouroquinolonas inibem a atividade dos enzimas DNA girase ou do DNA topoisomerase II, enzimas que regulam a topologia da cadeia de DNA.^(21, 41, 47) O DNA girase é um enzima que leva ao empacotamento da cadeia de DNA, passando esta da forma linear para a forma enrolada, o que favorece a sua expressão, replicação e recombinação. A inibição deste enzima, impede a conversão da forma linear para a forma enrolada, ficando deste modo extremidades livres, que levam a uma síntese descontrolada de mRNA e proteínas, produção de exonucleases e degradação cromossomal, levando à morte celular.⁽⁴¹⁾

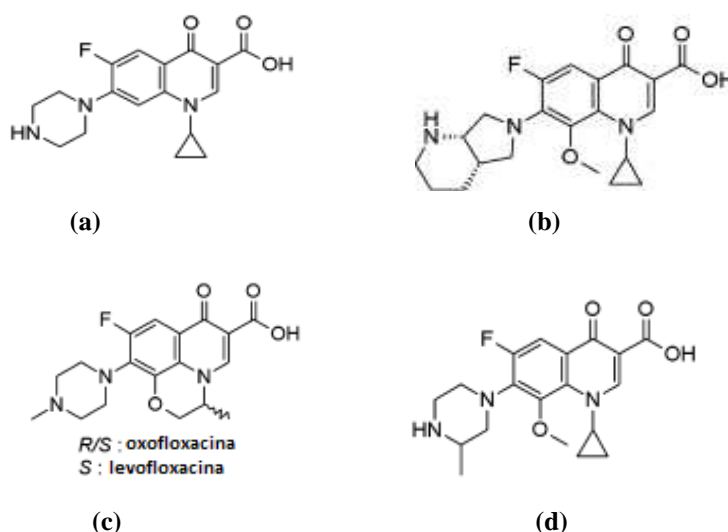


Figura 1.9- Representação das estruturas químicas da ciprofloxacina(a); moxifloxacina (b), oxofloxacina e levofloxacina (c); gatifloxacina (d)⁽⁴⁸⁾

A cicloserina (CS) (Figura 1.10a) é um composto com atividade bacteriostática e um análogo estrutural da D-alanina e como tal atua como antagonista competitivo para os enzimas D-alanil-D-alanina sintetase, alanina racemase e alanina permease, que intervêm na síntese do peptidoglicano da parede bacteriana.^(21, 41, 47)

Outro fármaco de 2ª linha, a etionamida (ETH) (Figura 1.10b), um análogo estrutural da INH é um pró-fármaco que necessita da ativação do enzima EthA, um monooxigenase que contém FAD específico para o NADPH, para exercer a sua acção. Tal como a INH o seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica, impedindo a síntese do ácido micólico e estimulando reações de oxidação-redução, levando à rutura da parede bacteriana e consequente morte bacteriana.^(21, 41)

O ácido para-acetilsalicílico (APAS) (Figura 1.10c) é um tuberculostático com efeito bacteriostático e atua ao nível dos bacilos extracelulares. O seu mecanismo ainda não foi bem esclarecido, mas parece estar envolvido na síntese do ácido fólico bacteriano e na inibição da captação do ferro.⁽⁴¹⁾ O APAS deriva de um ácido carboxílico mais simples, o ácido benzóico (BA) (Figura 1.10d). Nos anos 40, Bernheim, concluiu que ocorreria uma oxidação rápida do ácido benzóico pelo *Mycobacterium smegmatis*, contribuindo para o crescimento antimicobacteriano.⁽⁴⁹⁾ Este ácido demonstrou ser pouco ativo no *M. smegmatis*, tendo sido abandonado o seu uso. No entanto mais tarde, Zhang e seus colaboradores concluíram que o *M. tuberculosis* apresenta uma grande susceptibilidade aos ácidos fracos, apontando para uma possibilidade de derivados deste ácido poderem ser incluído na terapia antimicobacteriana.⁽³⁾

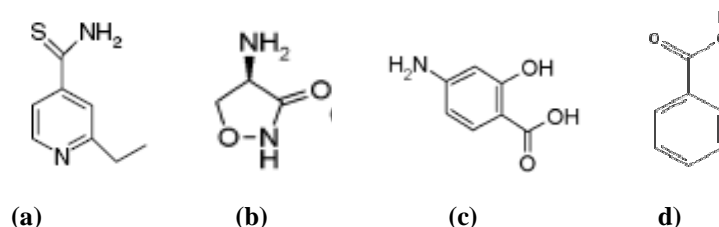


Figura 1.10- Representação das estruturas químicas da etionamida(a); cicloserina (b); ácido para-acetilsalicílico (c) e ácido benzóico (d) ^(48, 50)

No tratamento da tuberculose, a escolha da terapia depende da formulação, mecanismo de ação e processo inibido. A Tabela 1.1 resume os fármacos usados no tratamento da tuberculose:

Tabela 1.1- Fármacos usados na tuberculose e respetivos mecanismos de atuação. ^(35,37)

Fármaco	Via	Classe	Modo de acção	Processo inibido
INH	oral	1ª linha	Bactericida	Inibição da síntese dos ácidos micólicos devido à formação de ROS
RFP	oral	1ª linha	Bactericida	inibição da RNA polimerase
PZA	oral	1ª linha	Bactericida	inativação de enzimas que intervêm na biossíntese dos ácidos micólicos(?)
SM/CAN/AMI	injectável	2ª linha	Bactericida	inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 30S
flouroquinolonas	oral	2ª linha	Bacteriostático(CIP/OFX) Bactericida(LFX, MFX, GFX)	Inibição dos enzimas DNA topoisomerase II e DNA girase
CS	Oral	2ª linha	Bacteriostático	inibição de enzimas que intervêm na síntese dos peptidoglicanos.
ETH	Oral	2ª linha	Bacteriostático	síntese dos ácidos micólicos e síntese proteica
APAS	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Desconhecido

1.3.2.2.3 - Efeito do pH na susceptibilidade a pró-fármacos

Conforme referido anteriormente, a resistência à pirazinamida normalmente está relacionada com mutações no gene *pncA* e um mecanismo de efluxo deficiente. No entanto, o pH externo é também um fator importante na susceptibilidade a antimicrobianos. Uma prova disso é a pirazinamida ser apenas ativa no *Mycobacterium tuberculosis* a um pH ácido.^(3, 4, 51, 52) Este facto está relacionado com a maior acumulação de ácidos fracos, uma vez que o equilíbrio é atingido quando a concentração da forma ionizada ou neutra em ambos os lados da membrana é igual.⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

A diminuição do pH também influencia a atividade dos antimicrobianos. De facto, encontra-se descrito que a atividade do POA e do BA em *M. tuberculosis* são maiores a pH ácido.^(3-5, 52) A pH interno neutro o BA com um pK_a de 4,2 encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, pelo que não consegue atravessar a membrana micobacteriana. Quanto ao pH externo, a acumulação do BA é maior a pH ácido, uma vez que apenas 8% deste composto se encontra na forma neutra, a pH

normal (6,5). Isto acontece, porque em pH ácido, os ácidos fracos encontram-se na sua forma protonada formando espécies neutras, que se difundem facilmente ao longo da membrana, ficando esta espécie acumulada no seu interior, devido ao mecanismo de efluxo deficiente neste organismo.^(4, 53) Assim, pensa-se que o mecanismo de ação proposto para a pirazinamida será o mesmo para outros derivados de ácidos fracos (Figura 1.11).

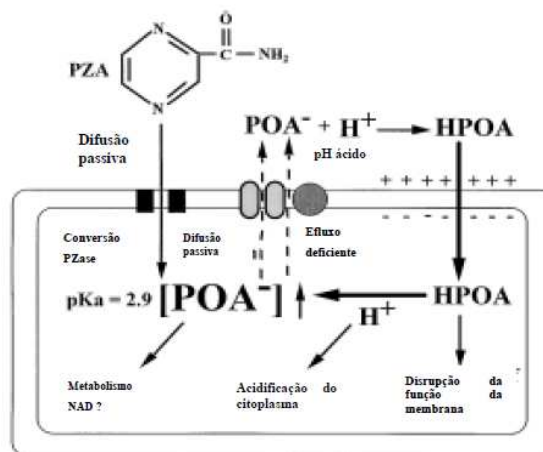


Figura 1.11- Mecanismo de acção proposto para a pirazinamida e para outros derivados de ácidos fracos.⁽⁴⁵⁾

Além de influenciar a permeabilidade de fármacos ao longo da membrana, o pH também influencia o crescimento micobacteriano, ao nível do potencial da membrana.⁽⁴⁶⁾ Sabe-se que a pirazinamida não só intervém ao nível da síntese dos ácidos micólicos mas também exerce a sua ação, através da disrupção do potencial de membrana, influenciado pelo pH.⁽⁴⁶⁾ Assim, a pH ácido, a acumulação de ácido pirazinóico afecta o potencial de membrana, afetando o transporte membranar e consequentemente a ação das bombas de efluxo. A diminuição do potencial da membrana leva à inibição da síntese do ATP pela F_1F_0 ATPase, havendo um esgotamento das reservas de energia existentes nas células, o que diminui a viabilidade celular.⁽⁴⁾

Recentemente, um estudo realizado por Min Rao e seus colaboradores (2001) demonstrou que o máximo de crescimento do *M. smegmatis* ocorre a um pH externo de 7,0 ocorrendo uma diminuição do crescimento, à medida que o pH vai diminuindo para um intervalo entre 4,5 e 7.⁽⁵²⁾ O mesmo se observa para a BCG.⁽⁵⁶⁾ Quando o pH exterior diminui, o pH interno mantém-se entre 6,1-7,0 o que demonstra que ocorre uma

homeostasia.^(53, 54) De facto, quando se usou o CCCP, um protonóforo, composto que promove o fluxo de protões para equilibrar o pH interno e o pH externo, observou-se que para valores de pH interno abaixo de 6,0 (pH letal) ocorre um decréscimo na sobrevivência e viabilidade celulares. Este facto prova que a causa da morte celular em condições acídicas é a quebra do pH interno e não propriamente do pH externo.⁽⁵⁶⁾

A tentativa de manter o pH interno alto, mesmo em condições de inibição de crescimento e da síntese de ATP leva a um decréscimo da energia disponível para o crescimento celular. Assim, em condições acídicas, ocorre uma inibição do crescimento micobacteriano, o que permite que toda a energia sintetizada seja usada para manter o pH interno, essencial para o crescimento bacteriano.⁽⁵⁶⁾

1.4- Pró-fármacos

Pró-fármaco é a forma inativa de um fármaco que exerce o seu efeito, somente quando é convertido na sua forma ativa, por mecanismos químicos ou enzimáticos.⁽⁵⁷⁾ Esta conversão é especialmente importante, uma vez que existem determinadas barreiras na fase farmacêutica, como a baixa solubilidade, baixa estabilidade química, odor, irritação e na fase farmacocinética, como a absorção demasiadamente rápida e a baixa seletividade no órgão ou tecido que limitam a ação de um fármaco.^(58, 59) Deste modo, ao desenvolver um pró-fármaco, os principais objetivos a ter em conta são: modificação do perfil farmacocinético, aumento da duração de ação, diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários, aumento da seletividade, resolução de problemas na formulação, como a estabilidade, solubilidade e outras propriedades.⁽⁵⁹⁾

Os pró-fármacos podem ser classificados em: pró-fármacos clássicos, pró-fármacos mútuos, biopercursos e pró-fármacos dirigidos. Pró-fármacos clássicos são aqueles que se encontram ligados a um transportador, que por sua vez se encontra ligado a um grupo amina, hidroxilo ou carboxilo e que normalmente são menos ativos do que fármacos. Por seu lado, os biopercursos são moléculas resultantes da modificação molecular, com a formação de um novo composto, que ao sofrer metabolização se transforma no fármaco ativo. Os biopercursos não possuem um transportador, sendo geralmente ativados pela formação de um grupo funcional.⁽⁵⁹⁾ Os pró-fármacos mútuos são compostos por dois ou mais fármacos, com efeito sinérgico, em que um é transportador do outro e encontram-se ligados entre si através de uma

função química ou de um braço de ligação.^(60, 61) Por último, os pró-fármacos dirigidos constituídos por transportadores que transportam os fármacos seletivamente até ao local de ação.^(58, 61)

Os pró-fármacos podem possuir várias ligações, no entanto, o sucesso da conversão em fármaco ativo irá depender também da abundância dos enzimas, responsáveis por essa conversão. De facto, verificou-se anteriormente que as amidas são geralmente mais resistentes à hidrólise do que os ésteres.⁽⁶²⁾ Por exemplo, muitas moléculas polares apresentam problemas de lipofilia, que podem ser contornados mascarando um grupo funcional polar com um grupo alquilo ou acilo. Assim, é possível mascarar um álcool ou um fenol, convertendo-os num éter ou num éster e mascarar um ácido carboxílico, convertendo-o num éster ou amida.⁽⁴⁷⁾

Um dos principais objetivos a ter em conta no desenvolvimento de novos fármacos é a otimização das estruturas dos compostos, de modo a melhorar o seu acesso ao alvo. Para cumprir este objetivo, é necessário que um fármaco possua uma estrutura química que lhe permita ultrapassar as barreiras de forma eficaz, seja suficientemente estável até chegar ao seu local de ação e tenha um tempo de eliminação suficientemente razoável de modo a evitar a sua posterior acumulação no organismo.⁽⁴⁷⁾ Deste modo, existem várias propriedades de um fármaco que podem ser otimizadas, de modo a que este possa atingir ao seu alvo de forma eficiente. Nesse aspeto, as propriedades hidrofílicas e hidrófobas são de grande importância, uma vez que influenciam a solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco. Por exemplo, moléculas muito polares e hidrofílicas têm uma baixa absorção, por outro lado moléculas demasiadamente hidrofóbicas acumulam-se nos tecidos ricos em gorduras e são pouco solúveis no sangue, diminuindo a sua biodisponibilidade.⁽⁴⁷⁾

1.4.1- Ésteres como pró-fármacos

Os pró-fármacos com grupos éster são os mais usados no desenvolvimento de fármacos, visto que permitem mascarar certos grupos funcionais com propriedades desfavoráveis a nível farmacocinético.

De facto, a hidrólise de pró-fármacos com ligações éster por esterases é uma das reações mais comuns, visto que muitos pró-fármacos contêm uma ligação éster, derivada de um grupo hidroxílico, fenólico e carboxílico presente no fármaco.⁽⁴⁷⁾

Compostos com um grupo ácido carboxílico farmacologicamente ativo podem, no entanto, apresentar uma baixa biodisponibilidade. Para ultrapassar este problema, recorre-se à esterificação do ácido carboxílico, de modo a aumentar a lipofilia. Deste modo, muitos fármacos possuem uma ligação éster, que resulta da derivatização de um grupo hidroxilo, carboxilo ou fenilo existente na molécula libertando o fármaco ativo quando é clivada.⁽⁶³⁾

Outro dos problemas associados aos pró-fármacos com grupos éster é a estabilidade, uma vez que os ésteres são facilmente hidrolisados, e por isso um fármaco que contenha estes grupos terá tempos de meia-vida mais reduzidos. No entanto, esta situação pode ser contornada, através da adição de um grupo alquilo volumoso, como o *terc*-butilo, de modo a impedir a aproximação de um nucleófilo ou de um enzima ao grupo susceptível de sofrer hidrólise.⁽⁴⁷⁾ Além disso, também se pode tornar os ésteres mais sensíveis à hidrólise ao introduzir grupos atratores de eletrões na porção aciloxílica. Estes grupos exercem um efeito indutivo, que contribui para o mecanismo de hidrólise, uma vez que torna o grupo da porção alcoxílica um bom grupo abandonante.⁽⁴⁷⁾

1.4.2 - Hidrólise química

O termo hidrólise geralmente refere-se à quebra de ligações químicas por adição de uma molécula de água. No caso da hidrólise química de ésteres, ocorre a formação de um ácido e de um álcool, a partir da clivagem de um grupo éster, com incorporação de uma molécula de água.

A hidrólise química de um derivado de um ácido carboxílico pode ser catalisada por um ácido ou por uma base, e em ambos os casos, ocorrem reações de adição-eliminação, com formação de um intermediário tetraédrico (Figura 1.12).

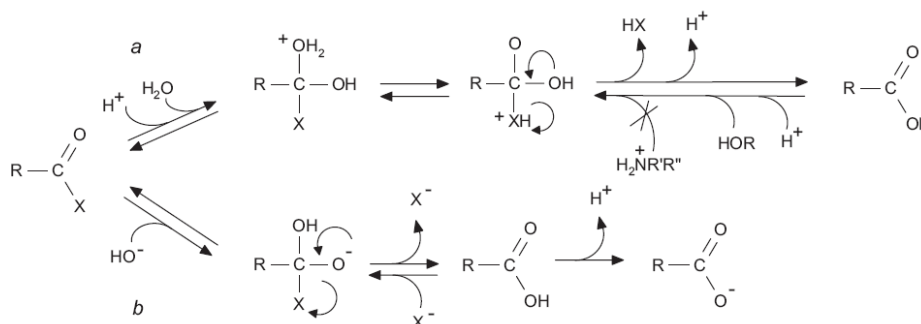


Figura 1.12- Esquema geral da hidrólise química de ésteres e amidas derivados de ácidos carboxílicos, via catálise ácida (a) e catálise básica (b).⁽⁶⁴⁾

Na catálise ácida (Figura 1.12a), ocorre a protonação do oxigênio do grupo carbonilo, formando-se assim um intermediário tetraédrico com excesso de carga positiva, facilitando a adição do nucleófilo, ou seja da molécula de água. Este processo é reversível, uma vez que o álcool libertado é um substrato nucleófilico, podendo atacar posteriormente o ácido carboxílico formado. Na catálise básica (Figura 1.12b), o intermediário tetraédrico é formado por adição do íon HO^- . Esta reação é irreversível, uma vez que o ácido carboxílico formado é desprotonado em meio básico e não pode ser atacado pelos substratos nucleófilos formados.⁽⁶⁴⁾

A reatividade dos derivados de ácidos carboxílicos irá depender do caráter de dador ou aceitador do substituinte na porção aciloxílica como também da capacidade dos grupos álcool ou amina para serem ou não bons grupos abandonantes.⁽⁶⁴⁾

1.4.3- Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática consiste numa reação de hidrólise comum, em que há intervenção de um enzima, que atua como catalisador, ou seja acelera a reação. Este tipo de hidrólise é mais eficiente do que a hidrólise química, uma vez que ocorre um decréscimo da energia de Gibbs, sendo portanto ultrapassada a barreira de energia no estado de transição.^(64, 65) As hidrolases são enzimas pertencentes ao grupo 3 na classificação de enzimas, segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology IUBMB e catalisam reações de hidrólise.⁽⁶⁵⁾ Estes enzimas apresentam uma estrutura bastante particular, uma vez que possuem três locais catalíticos no seu centro ativo, o que acelera consideravelmente a velocidade da reação (Figura 1.13). Estes três locais catalíticos incluem: um componente electrofílico (Z^+), que aumenta a polarização

do grupo carbonilo no substrato; um nucleófilo (Y:), que ataca o grupo carbonilo e permite a formação do intermediário tetraédrico, e por último um dador de prótons (H-B), que transforma o grupo - OR' num melhor grupo abandonante.⁽⁶⁴⁾

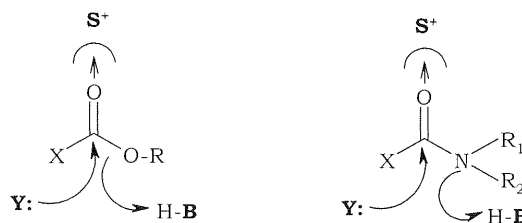


Figura 1.13- Estrutura da tríada catalítica das hidrolases, na hidrólise de derivados de ácidos carboxílicos.⁽⁶⁴⁾

Com base na estrutura do seu centro ativo, as hidrolases podem ser divididas em cinco classes: hidrolases de serina, de treonina, de cisteína, de ácido aspártico e metalo-hidrolases. Existem hidrolases cujo mecanismo ainda é desconhecido.⁽⁶⁴⁾ Além de possuir uma estrutura bastante particular, as hidrolases ainda apresentam uma especificidade para uma vasta gama de substratos: péptidos, amidas, haletos, ésteres e triglicéridos.⁽⁶⁶⁾ Sendo assim, a sua classificação será feita, tendo em conta o substrato que hidrolisam- substrato + prefixo “ase”. Por exemplo, a designação atribuída aos enzimas que hidrolisam grupos éster será esterases.⁽⁶⁵⁾

1.5 -Esterases

Os esterases são enzimas que intervêm nas reações em que ocorre a conversão de pró-fármacos derivados de ésteres. Segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), estas enzimas pertencem à classe 3, grupo dos hidrolases e participam na maioria das reações em que o grupo éster está envolvido, devido ao facto da ligação éster ser bastante lábil, e por isso muito fácil de quebrar.^(63, 67) Estes enzimas são muito abundantes, estando distribuídos por todo o corpo.

Os esterases são classificadas de acordo com a ligação éster que clivam:

- Carboxilesterases (EC 3.1.1);
- Tio-esterases (EC 3.1.2);
- Fosfoesterases (EC 3.1.3, EC 3.1.4, EC 3.1.5, EC 3.1.7, EC 3.1.8);
- Sulfatases (EC 3.1.6);
- Nucleases (EC 3.1.11-31);⁽⁶⁴⁾

Os enzimas mais importantes deste grupo são os carboxiesterases, os butirilcolinesterases, os acetilcolinesterases, paraoxonases e os arilesterases.

Deste grupo é importante destacar os carboxiesterases. Estes enzimas catalisam a hidrólise de ésteres ligados a grupos carboxílicos, por adição de moléculas de água⁽⁶⁸⁾ e pertencem à família das α/β hidrolases.⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾ Um das caraterísticas partilhadas pelos membros deste grupo é a existência de um *core* similar: estrutura em folha α/β , composta por oito folhas β ligadas por hélices α - Figura 1.14.^(68, 69, 71) Esta família inclui colinesterases, hidrolases, lípases e fosfatotriesterases (como o paraoxonase). As suas propriedades catalíticas estão ligadas à existência de uma tríada catalítica formada um nucleófilo, um ácido e histidina. O resíduo de aminoácido presente que atua como nucleófilo nem sempre é o mesmo, podendo ser serina, cisteína ou aspartato.⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ As α/β hidrolases é o único exemplo de família de enzimas, onde o resíduo de glutamato é usado como ácido na tríada catalítica. A torção da folha β central permite que pequenos péptidos se aproximem, de modo a juntar os resíduos da tríada, formando uma estrutura enzimática catalicamente ativa.⁽⁷¹⁾

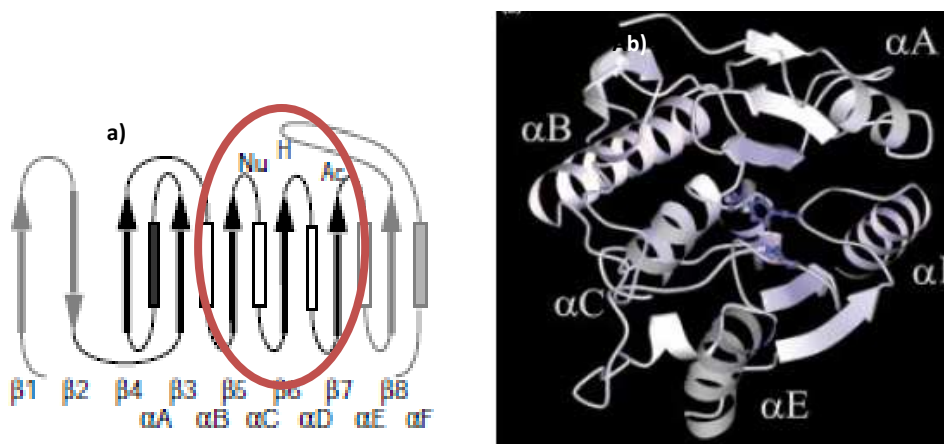


Figura 1.14- Diagrama topológico do fold mínimo das α/β hidrolases com a tríada catalítica demarcada a vermelho(a) tríada catalítica das α/β hidrolases na carboxilesterase do *Pseudomonas fluorescens* (b).⁽⁷¹⁾

Além da suas propriedades catalíticas, estes enzimas também possuem uma ampla distribuição, uma vez que se encontram num grande variedade de tecidos e órgãos.^(64, 72) A maior atividade destes enzimas foi detectada no fígado⁽⁷²⁾, no entanto estes também apresentam grande atividade nos rins e no intestino delgado. Adicionalmente também podem ser detetados no coração, no cérebro, no tecido adiposo, na mucosa nasal e respiratória e nos testículos.^(64, 68)

1.5.1- Esterases no plasma humano

Os esterases do plasma humano desempenham um papel importante no metabolismo de fármacos. Intervêm sobretudo na ativação de pró-fármacos derivados de ésteres; na inativação de fármacos e na desintoxicação de substâncias tóxicas sintéticas e naturais, que contêm grupos éster.⁽⁷³⁾

No plasma humano existem 3 grupos de esterases:

- butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8),
- paraoxonase (EC 3.1.8.1),
- acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7),⁽⁷³⁾

Além destes três grupos, no plasma ainda uma proteína muito abundante, a albumina.⁽⁷³⁾

O acetilcolinesterase existente no plasma humano encontra-se apenas em pequenas quantidades.⁽⁷³⁾ Este enzima desempenha as suas funções ao nível do sistema nervoso central e periférico. A sua principal função é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que actua ao nível dos neurónios pré-sinápticos, impedindo assim a sua libertação para a fenda sináptica.⁽⁷⁴⁾ Este neurotransmissor está relacionado com patologias como a doença de Parkison e de Alzheimer, sendo que a terapia usada para minimizar os efeitos destas doenças se baseia no acetilcolinesterase.⁽⁷⁵⁾

O butirilcolinesterase é um dos enzimas mais abundantes no plasma. Este enzima tem como principal função hidrolisar os neurotransmissores butirilcolina e acetilcolina.⁽⁷⁶⁾ Além disso, intervém diretamente na eliminação de uma série de substâncias tóxicas como a procaína, cocaína, ácido acetilsalicílico, entre outras e na proteção do organismo contra os organofosfatos.^(76, 77)

O paraoxonase é um sistema enzimático, qual pertencem três membros: paraoxonase 1 (PON1), paraoxonase 2 (PON2) e paraoxonase 3 (PON3). Destes três membros apenas o PON1 se encontra presente no plasma humano. Este sistema enzimático possui propriedades antioxidantes, protegendo o organismo contra as doenças cardiovasculares e a arterioesclerose.^(63, 73)

A albumina é a proteína mais abundante do plasma humano, podendo ser denominada albumina sérica humana (ASH).^(78, 79) A principal função deste enzima é controlar a pressão osmótica, tendo também um papel importante na regulação da

distribuição de fluidos entre os compartimentos corporais. Esta proteína possui ainda uma admirável capacidade de ligação, pelo que muitos compostos exógenos e endógenos são distribuídos pelo organismo ligados à albumina. A ASH tem um papel farmacocinético, uma vez que afecta o metabolismo de muitos dos seus ligandos. É considerada uma *pseudo*-enzima, uma vez que não possui atividade catalítica específica, no entanto, foi constatado que intervém na hidrólise de fármacos, apresentando um mecanismo de catálise semelhante ao dos esterases.⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾ Apesar desta proteína não possuir atividade catalítica específica, apresenta na sua estrutura, um centro reativo e múltiplos locais catalíticos não específicos. No seu centro ativo possui três centros reativos: local R, local T e local U. O local R é o centro reativo primário, sendo composto por um resíduo de histidina e um resíduo de tirosina (Tyr-411). O local T é considerado um centro secundário, contribuindo para a atividade de esterase da proteína possuindo um resíduo de lisina que atua como centro catalítico. Por último, possui o local U, que se encontra próximo de um resíduo de triptofano (Trp-214).⁽⁷⁹⁾

No plasma, são apenas estes quatro tipos de esterases que intervêm diretamente na hidrólise de ésteres.

1.5.2 - Esterases de micobactérias

Conforme referido anteriormente, a parede celular das micobactérias tem elevado conteúdo lipídico, sendo rico em vias biossintéticas de lípidos, o que pressupõe a existência de enzimas que hidrolisem estes grupos com atividade de lipases. De facto uma análise do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* permitiu constatar a existência de um grande número de enzimas que intervêm na degradação dos ácidos gordos presentes na membrana da micobactéria^(81, 82), Foram identificados 24 genes que codificam para enzimas lipolíticos, os quais constituem a chamada “família Lip”. No entanto, esta classificação é apenas baseada na existência de uma sequência *consensus*, característica dos membros da família das hidrolases α/β . A partir da análise genómica, não é possível distinguir lipases de esterases. Uma posterior análise, usando a ferramenta básica de procura de alinhamento local (Blast) permitiu concluir que a família Lip é constituída tanto por lipases como por esterases.⁽⁸³⁾ Enquanto os esterases clivam as ligações éster existentes nos ácidos gordos de cadeia curta, as lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de lípidos, apresentando por isso uma maior gama de substratos do que os esterases.⁽⁸⁴⁾ Sendo assim os esterases constituem um grupo de

enzimas bastante versátil, podendo apresentar outros tipos de atividade, como por exemplo: fosfolipase, amidase, cutinase, colesterol esterase, lisofosfolipase entre outras.^(84, 85)

Nos últimos anos foram identificadas algumas carboxiesterases, que se pensa estarem envolvidas na hidrólise de ésteres derivados de ácidos carboxílicos. Nesse aspecto, foram identificadas no *Mycobacterium tuberculosis* duas carboxiesterases da família Lip: a Rv3487c e a Rv1399c. Ambas podem hidrolisar de forma eficiente, ésteres de cadeia curta. A Rv3487c pertence à família das α/β hidrolases e por isso apresenta uma tríada catalítica típica deste grupo de enzimas. A tríada catalítica possui um resíduo de serina, como nucleófilo; um resíduo de histidina, como transportador de prótons e um resíduo de glutamato ou aspartato, como grupo ácido. Deste modo, o seu centro catalítico tem a seguinte constituição: Ser90-Glu189-His219, possuindo o glutamato em vez do aspartato, ao contrário do que acontece na carboxilase Rv1399c. Tanto o aspartato como o glutamato encontram-se fortemente ligados ao grupo azoto da histidina, contribuindo para a estabilização da carga positiva e tautomerização correta da histidina, bem como para aquisição de uma conformação correta e estável.⁽⁸⁶⁾

Em 2010, Guo e seus colaboradores, identificaram a Rv0045c, um esterase que está envolvido no metabolismo de lípidos e ésteres no *Mycobacterium tuberculosis*.⁽⁸⁷⁾ Este enzima possui uma estrutura secundária em folha β , o que está de acordo com o *folding* normalmente apresentado pelas α/β hidrolases. Um alinhamento de sequência dos aminoácidos mostrou que a sequência de *consensus* (G-X-S-X-G), característica das hidrolases se encontrava conservada e que o centro catalítico possui os aminoácidos Ser89, Asp113, Ser206 e His234, normalmente presentes na tríada catalítica. Tal como o Rv3487c e o Rv1399c, pensa-se que este esterase também terá como substratos ésteres de cadeia curta derivados do 4-nitrofenol.⁽⁸⁷⁾

Além de terem sido identificados esterases que hidrolisam ésteres derivados de ácidos carboxílicos, também foram identificados esterases que além de intervirem na hidrólise de ésteres, ainda activam a resposta imune. Um destes enzimas é o Rv0220, um esterase de superfície que também pertence à família Lipc (Figura 1.15). Este enzima, além de intervir na degradação de ácidos gordos ainda participa ativamente na resposta imune estimulando a produção de anticorpos. Tal como, a Rv1399c este enzima contém um resíduo de aspartato na sua tríada catalítica.⁽⁸⁸⁾



Figura 1.15 - Representação da estrutura da LipC (Rv0220).⁽⁸⁸⁾

Outros esterases que parecem estar envolvidos com a ativação das células do sistema imunitário são: Rv0183, Rv1984c, Rv3097c e Rv3452. A primeira parece estar relacionada com as interações entre as células e as bactérias e tem como substrato principal o monoacilglicerol. A Rv1984c intervém na hidrólise de ésteres de cadeia média derivados de ácidos carboxílicos e monoacilgliceróis. Por outro lado o esterase Rv3097c tem atividade de triacilglicerol (TAG) hidrolase, estando presente na superfície celular da micobactéria. Por último o Rv3452 tem atividade de fosfolipase e induz a lise dos macrófagos.⁽⁸⁹⁾

1.6 - Ácidos fracos com ação antimicobacteriana

A resistência natural a muitos fármacos antimicobacterianos tem levado à procura de alternativas, que permitam contornar este problema. Embora a pirazinamida seja um antimicobacteriano bastante usado na terapia da tuberculose, têm-se desenvolvido algumas resistências a este fármaco. No entanto, *Zhang* e os seus colaboradores (2003), concluíram que o *Mycobacterium tuberculosis* é a única micobactéria que é susceptível ao ácido pirazinóico, forma activa da pirazinamida, o que apontou para a possibilidade de haver susceptibilidade para os ácidos fracos.⁽³⁾

Um dos ácidos fracos que parece ser activo contra o *Mycobacterium tuberculosis* é o ácido salicílico (AS). Este ácido é normalmente usado como anti-inflamatório para reduzir a febre.⁽⁹⁰⁾ No entanto, Ratledge (1966) estudou a relação entre o AS e o crescimento da micobactérias, nomeadamente o *Mycobacterium smegmatis*, tendo observado que esta micobactéria não conseguia metabolizar o AS e utilizá-lo para o seu crescimento, provavelmente devido à sua dificuldade de entrar para dentro das

células.⁽⁹¹⁾ De facto, este ácido fraco demonstrou uma baixa atividade no *Mycobacterium smegmatis*, no entanto parece ser bastante activo no *M.tuberculosis* Ra.⁽⁴²⁾

Outro ácido fraco que foi estudado foi o ácido acetilsalicílico (ASA). Este ácido derivado do ácido salicílico e também é usado como anti-inflamatório não esteróide (AINE) na dor, febre e inflamação.⁽⁹²⁾ O ASA também se encontra associado ao crescimento de micobactérias. Ao contrário do ácido salicílico, o ASA parece facilitar o acesso intracelular ao ferro, contribuindo para o crescimento do *M. smegmatis*.⁽⁹³⁾ Por esta razão, o ASA demonstrará pouca atividade nesta micobactéria. No entanto, este ácido demonstrou ser bastante ativo contra o *M. tuberculosis*, principalmente a pH 5,9.⁽³⁾ Também um estudo realizado por Simões (2009) veio demonstrar que o ASA quando associado à pirazinamida potencia a atividade desta.⁽⁹⁴⁾

O ácido nicotínico (NA), também denominado niacina ou vitamina B3 normalmente encontra-se associado ao tratamento de dislipidémias.⁽⁶¹⁾ No entanto, análogos estruturais do NA, POA e do ácido isonicotínico (INA) como INH, demonstraram atividade contra o *M. tuberculosis*.^(2, 3, 41) Assim, avaliou-se se o *Mycobacterium tuberculosis* seria susceptível a estes ácidos. No estudo realizado por Zhang e seus colaboradores (2003), o NA e o INA demonstram alguma atividade contra o *M. tuberculosis*, no entanto esta atividade é bastante baixa comparativamente às atividades demonstradas pelos outros ácidos.⁽³⁾

Durante alguns anos, Bernheim e colaboradores (1942) estudaram a relação entre o ácido benzóico e o crescimento micobacteriano, chegando à conclusão que ocorreria a oxidação do ácido benzóico, como fonte de carbono no *Mycobacterium smegmatis*.⁽⁴⁹⁾ Apesar de este ácido não demonstrar grande atividade nesta micobactéria, parece ser bastante activo no *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente a pH ácido.⁽³⁾ De facto, um estudo posterior realizado por Wade (2006) demonstrou que o ácido benzóico quando combinado com a pirazinamida potenciava a sua acção, confirmando mais uma vez a sua possível ação antimicobacteriano.⁽⁹⁵⁾

Além destes ácidos, recentemente concluiu-se que o ácido 4-nitrobenzóico podia servir como marcador, para diferenciar o MTC das NTM, uma vez as bactérias pertencentes a este complexo apresentam grande susceptibilidade a este ácido.^(96, 97)

A susceptibilidade do *M. tuberculosis* a estes ácidos fracos com estruturas tão diferentes está relacionada com o facto de estes exercerem um efeito na disrupção do

potencial da membrana. Todos estes ácidos demonstram ser mais activos a pH ácido, devido ao seu pKa baixo⁽³⁾

1.7 - Pró-fármacos derivados de ácidos fracos.

Embora os ácidos fracos tenham demonstrado atividade contra o *M. smegmatis*, no entanto estes não podem ser usados directamente como antimicobacterianos, pois possuem algumas limitações. Algumas destas limitações incluem a sua fraca absorção ao nível do tracto gastrointestinal bem como a dificuldade de se ligarem a proteínas do plasma. Assim será necessário desenvolver pró-fármacos derivados destes ácidos que possam ser usados *in vivo*.⁽³⁾ Além disso, os derivados dos ácidos fracos deverão ser hidrolisados pelos enzimas presentes no *M. tuberculosis*.

Deste modo, desenvolveram-se como pró-fármacos, ésteres ou amidas derivados destes ácidos fracos. Por exemplo, a nicotinamida demonstrou atividade antimicobacteriana *in vivo*.⁽⁹⁸⁾ No entanto, as amidas demonstraram ser mais resistentes às hidrólises do que os ésteres, tendo deste modo sido desenvolvidos pró-fármacos baseados em ésteres derivados do ácidos fracos⁽⁶⁾

Nesse sentido, uma das abordagens tem sido utilizar como pró-fármacos, ésteres derivados do POA. Apesar disso, estes ésteres de cadeia curta apresentavam baixa estabilidade no plasma, tendo surgido a necessidade de sintetizar ésteres com cadeias mais longas. Os ésteres derivados do ácido pirazinóico sintetizados posteriormente já apresentavam cadeias alcóxílicas mais longas sendo por isso mais lipofílicos.^(40, 94, 99) O aumento da cadeia lateral aumentou assim a atividade antimicobacteriana e a estabilidade em plasma.⁽⁹⁹⁾

Além dos ésteres derivados do ácido pirazinóico, também foram testados ésteres derivados do ácido benzóico, os quais demonstram bastante atividade contra o *M. tuberculosis*, especialmente a pH ácido. De facto, estes pró-fármacos parecem ter não só uma maior biodisponibilidade como também uma maior capacidade de penetração para dentro da parede das micobactérias.⁽⁵⁾

O trabalho desenvolvido por Gu e seus colaboradores (2008) demonstrou a importância de fatores como a lipofilia e a polaridade na atividade dos derivados de ácidos fracos. Os derivados do ácido benzóico estudados, possuíam na porção alcóxílica cadeias lineares e ramificadas. Deste modo, foi possível estabelecer uma relação entre a

porção alcofílica e a lipofilia, uma vez que a susceptibilidade do *M. tuberculosis* aos ácidos aumentou à medida que aumentava o coeficiente de partição ($\log P$).⁽⁵⁾

Embora, estes derivados fossem mais simples, outros derivados hidrazina e hidrazona foram sintetizados e mostraram ter atividade contra o *M. tuberculosis*.^(100, 101) Além disso, nos derivados hidrazona, foram introduzidos substituintes eletroatratores como o cloro e o nitro e substituintes electrodadores, como o CH₃ e o NH₃ na porção acilóximo da molécula. A presença de grupos eletroaceitadores no anel aromático aumentou a atividade antimicobacteriana, demonstrando que possivelmente existe uma relação entre os substituintes na porção alcóximo e a atividade.^(100, 101)

Além de testar a atividade dos derivados do ácido benzóico, também era necessário avaliar se estes apresentavam uma boa estabilidade, quando sujeitos à hidrólise química e enzimática. No trabalho desenvolvido por E. Valente (2009)⁽⁴⁰⁾ foram estudados pró-fármacos derivados dos ácidos benzóico, nicotinóico e pirazinóico, tendo sido analisada a sua estabilidade em tampão fosfato bem como em plasma humano, homogenato de micobactérias e homogenato de fígado de rato. Será conveniente que os pró-fármacos sofram hidrólises lentas tanto em plasma como no fígado de modo a atingirem o alvo para que foram desenvolvidos e uma hidrólise rápida pelos esterases das micobactérias, neste caso o alvo onde devem atuar. No que diz respeito à atividade, verificou-se que benzoatos com cadeias alcofílicas maiores apresentaram maior atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*, do que com cadeias alcofílicas menores.⁽³³⁾

1.8 - Objetivo do trabalho

O objetivo deste trabalho foi sintetizar ésteres derivados do ácido benzóico BA resistentes à hidrólise tanto no plasma como no fígado melhorando por outro lado a capacidade de ativação pelas micobactérias.

Uma das abordagens utilizada consiste em introduzir na cadeia alcofílica substituintes que melhorem a lipofilia, uma que em estudos anteriores se constatou que quanto maior o tamanho da cadeia alcofílica, maior será a lipofilia⁽⁶⁾ Para alcançar este objetivo foram sintetizados ésteres derivados do ácido benzóico com o propilo, fenilo e hexilo na sua cadeia alcofílica. Além disso, Zhang e seus colaboradores (2003)

sugeriram uma possível relação entre a atividade antimicobacteriana de ácidos fracos e o pK_a dos ácidos.⁽³⁾ Assim foram introduzidos substituintes na porção aciloxílica da molécula, no sentido de estudar o efeito do pK_a na estabilidade e atividade destes pró-fármacos.

Tendo em conta, todos estes efeitos dos substituintes tanto na porção alcóxílica, como na porção aciloxílica, foram estudados benzoatos com as seguintes modificações-Figura 1.16:

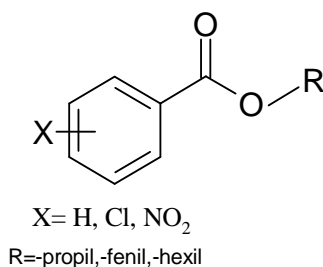


Figura 1.16 - Representação da estrutura da molécula de ácido benzóico e respectivos substituintes na porção aciloxílica (X) e na porção alcóxilo (R).

Conforme, já referido, estudos anteriores demonstraram que ésteres do ácido benzóico apresentam uma atividade maior a pH ácido.⁽⁵⁾ Assim, os estudos de atividade foram realizados a dois valores de pH (6,5 e 5,9), com o objetivo de averiguar o efeito do pH na atividade dos ésteres estudados. Também, será necessário avaliar a hidrólise química dos ésteres aos dois pH estudados. Deste modo, é proposto estudar a hidrólise química em tampão 7,4 e em tampão 5,9.

A estabilidade em tampão fosfato permitirá avaliar a hidrólise química ao passo que nos meios biológicos se observará a existência de hidrólise enzimática por esterases. Com os estudos de estabilidade em tampão, pretende-se averiguar se há ou não contribuição da hidrólise química para a velocidade de hidrólise no plasma que se utiliza numa suspensão a 80% em tampão a pH 7,4. Além disso, ao realizar os estudos de estabilidade em plasma humano, pretendemos avaliar se o pró-fármaco é suficientemente estável para sobreviver ao transporte no plasma e chegar ao seu local de ação.

Com base nos estudos de estabilidade e atividade, pretende-se escolher compostos que sejam ativos nas micobactérias, e ao mesmo tempo, apresentem uma hidrólise lenta em plasma e uma ativação rápida na presença das micobactérias. Os

compostos que apresentarem estas características poderão ser considerados potenciais pró-fármacos para o tratamento da tuberculose.

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2 - Procedimento Experimental

2.1 - Equipamento e material

Os espectros de infravermelho (IV) foram registados num aparelho *Nicolet Impact 400, Nicolet Instrument Corporation*.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos num espectrofotómetro *Bruker AMX-400 (400Hz)* na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Os desvios químicos são expressos em partes por milhão e constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno. Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: Núcleo (solvente); desvio químico (δ , ppm) [multiplicidade de sinal (*s*- singlete, *sl*- singlete largo, *d*-duplete, *t*-tripleto, *q*-quadripleto, *m*-multiplete), constante de acoplamento (*J*), intensidade relativa (nH, como número de prótons, atribuição na molécula)]. Os espectros obtidos para as estruturas dos compostos foram espectros de próton ^1H e carbono ^{13}C para a atribuição das estruturas dos compostos.

O ponto de fusão (p.f.) foi determinado num aparelho de placa aquecida *Bock monoscope M*.

Os estudos de HPLC foram realizados num sistema *Merck* constituído por um detetor de fotodíodos *L-3000 Photo Diode Array Detector*, uma bomba isocrática *Merck Hitachi L-6000*, um integrador *Merck-Hitachi D-2500* e uma coluna *Merck RP-8 250x4 mm* com partículas de 5 μm . Além deste sistema, foi usado um outro, constituído por uma bomba *Merck-Hitachi L-7100*, com injetor de amostras automático *Merck-Hitachi AS-2000*, detetor ultra-violeta (UV) *Merck-Hitachi UV L-7400* e um integrador *Merck-Hitachi D-2500*.

Os valores de pH foram medidos usando o aparelho medidor de pH *Crison micro pH 2002*.

Os ensaios das atividades micobacterianas foram avaliados pelo método de diluição seriada com placas de 96 poços sendo as leituras das densidades óticas ODs das placas de 96 poços num leitor de placas *Tecan's M200*. A observação das culturas das

micobactérias e das placas foi feita através do microscópio cofocal *Zeiss Axiovert* 200M.

Aparelho de ultra-sons utilizado foi um aparelho Bandelin sonorex Tk 52

2.2 - Reagentes e solventes

Os solventes usados foram adquiridos comercialmente nos seguintes fornecedores: Valente e Ribeiro Lda e José Manuel Gomes dos Santos Lda

Os reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente e usados sem purificação. Os fornecedores foram: *Panreac*, *Sigma Aldrich*, *Fluka*, *Merck* e *BDH*.

A maioria dos compostos utilizados na determinação das atividades e estudos de HPLC já tinham sido sintetizados anteriormente por outros elementos do grupo.

Os compostos estudados foram: ácido benzóico (BA), benzoato de propilo (BP), benzoato de fenilo (BF), benzoato de hexilo (BH), Ácido 4-nitrobenzóico (Ac 4NBz), 4-nitrobenzoato de propilo (4NBP), 4-nitrobenzoato de hexilo (4NBH), 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF), Ácido 4-clorobenzóico (Ac 4ClBz), 4-clorobenzoato de fenilo (4ClBP), 4-clorobenzoato de propilo (4ClBP), 4-clorobenzoato de hexilo (4ClBH), Ácido 3,5-ditronitrobenzóico (Ac 35dNBz), 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP), 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF), 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH), Ácido 2,6-diclorobenzóico (Ac 26dClBz), 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dClBP), 2,6-diclorobenzoato de fenilo (26dClBF) e 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dClBH).

Para os estudos de atividade antimicobacteriana utilizou-se nutriente de meio, Middlebrook 7H9 (*Difco*) ou (*Becton, Dickinson and Company*), com o enriquecimento de ácido gleico e albumina bovina associados a cloreto de sódio, dextrose e catalase (Middlebrook OADC) (*Becton, Dickinson and Company*) e ainda D-glucose, Tween 80, tiloxapol, glicerol, higromicina e kanamicina (*Sigma*) e dimetilsulfóxido (DMSO) (*Merck*).

2.3 - Síntese de derivados do ácido benzóico

Método geral

A síntese dos derivados do ácido benzóico tem por base a reação entre um cloreto de ácido e um álcool. Esta reação é processada através da adição gradual do álcool ao cloreto de ácido que se pretende derivatizar dissolvido em diclorometano, adicionando-se ainda um equivalente molar de trietilamina. Esta adição ocorreu sempre em banho de gelo, sendo a reação seguida por cromatografia de camada fina. Quando a reação é dada por terminada e após tratamento da mistura reacional de modo a eliminar o sal de trietilamínio formado e o cloreto de ácido que não reagiu, o composto sintetizado é purificado através de cromatografia em coluna usando o solvente ou solventes apropriados sendo o éster formado identificado por espectroscopia de ressonância nuclear de próton ^1H -RMN, de carbono ^{13}C -RMN e ainda por espectroscopia de infravermelho (IV).

Síntese do 4-clorobenzoato de propilo

A 5 mmol (0,376 mL) de propanol dissolvidos em 5mL de diclorometano e colocados sob atmosfera inerte de azoto em banho de gelo adicionaram-se 6 mmol de cloreto de 4-clorobenzoílo (0,763mL) e 6 mmol de trietilamina (0,697mL). A reação permaneceu à temperatura ambiente e sob a agitação durante a noite, tendo sido controlada por cromatografia de camada fina. No dia seguinte retirou-se por filtração o sal de trietilamínio formado e procedeu-se à lavagem do filtrado com 10 mL de água destilada e 2×10mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Procedeu-se à extração das fases aquosas com 3×20mL de diclorometano e à posterior secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se então o solvente a pressão reduzida sendo o resíduo obtido purificado por cromatografia em coluna (95/5, hexano/acetato de etilo).

Óleo, η =92 %

^1H - RMN (CDCl_3): δ (ppm) 7,97 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 7,40 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 4,27 (*t*, $J = 6,8$ Hz, 2 H), 1,83-1,74 (*m*, 2 H), 1,02 (*t*, $J = 7,4$ Hz, 3 H).

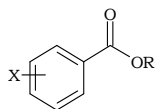
^{13}C - RMN (CDCl_3): δ (ppm) 165, 138, 130, 128, 128, 67, 21, 9, 7.

IV - (ν , cm^{-1}) - 1722,43

2.4 - Estudos de estabilidade dos ésteres derivados do ácido benzóico.

A estabilidade dos ésteres derivados do ácido benzóico foi estudada utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os estudos realizados em HPLC, foram realizados nos sistemas *Merck* descritos anteriormente. Tanto o detetor UV como o detetor fotodíodos foram regulados para um comprimento de onda de 230nm sendo usado um fluxo de 1,0 mL / min no eluente. Antes de proceder a esta análise, foi necessário escolher o eluente mais apropriado, de modo a obter-se uma boa separação entre o ácido e o éster e uma boa definição nos sinais cromatográficos. O eluente utilizado consistiu em misturas (70:30 a 60:40) de acetonitrilo : água contendo dihidrogeno ortofosfato de potássio (0,05M) e 0,05% (v/v) de ácido ortofosfórico (85%). A otimização da resolução foi obtida ajustando a proporção do acetonitrilo componente da fase móvel. Foram utilizados dois eluentes estando os tempos de retenção obtidos para os compostos estudados nas condições utilizadas indicadas na Tabela 2.1:

Tabela 2.1- Tempos de retenção obtidos pelo método de HPLC para os derivados do ácido benzóico de acordo com o eluente utilizado.



Composto	X	R	Eluente % ACN	tempo de retenção/min
AcBZ	H	H	60	2,72
BP	H	-C ₃ H ₇	60	6,80
BH	H	-C ₆ H ₅	60	14,82
BF	H	-C ₆ H ₁₃	60	5,82
Ac 35dNBA	3,5-NO ₂	H	60 70	3,27 2,95
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	60 70	6,27 4,50
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	60 70	9,03 5,78
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	60	6,84
Ac 4ClBA	4-Cl	H	60 70	3,94 3,03
4ClBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	60	8,70
4ClBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	60	8,84
4ClBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	70	11,84
Ac 4NBA	4-NO ₂	H	60 70	3,27 2,95
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	60	6,17
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	60	6,36
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	70	7,62
Ac 26dClBA	2,6-Cl	H	60 70	2,71 2,37
26dClBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	70	8,89
26dClBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	60	7,89
26dClBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	60 70	17,99 8,49

Os valores das constantes de *pseudo*-primeira ordem, k_{obs} para os diferentes estudos cinéticos efetuados foram determinados através da equação para cinéticas de 1ª ordem:

$$v = \frac{dc}{dt} \quad \text{exp. (2.1)}$$

ou seja: $dc/dt = k c \quad \text{exp. (2.2)}$

A concentração do composto decai exponencialmente ao longo do tempo, sendo expressa pela seguinte equação:

$$c = c_0 e^{-k t} \quad \text{exp. (2.3)}$$

$$\ln (c_t / c_0) = - k_{obs} t \quad \text{exp. (2.4)}$$

$$\ln c_t - \ln c_0 = - k_{obs} t \quad \text{exp. (2.5)}$$

$$\ln c = \ln c_0 - k_{obs} t \quad \text{exp. (2.6)}$$

Sendo c , a concentração do pró-fármaco determinada ao longo tempo, c_0 , a concentração inicial no tempo inicial ($t=0$). A constante de velocidade (k_{obs}) é calculado a partir do declive da equação da recta obtida nos gráficos \ln (área) em função do tempo. As reações de hidrólise foram seguidas ao longo do tempo, até se atingirem três meias vidas ou seja até se obter um valor de concentração oito vezes menor em relação ao valor de concentração inicial (Figura 2.1).

O tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) o tempo para o qual a concentração se reduz a metade pode ser obtido então pela seguinte equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln (2)}{k_{obs}} \quad \text{exp. (2.7)}$$

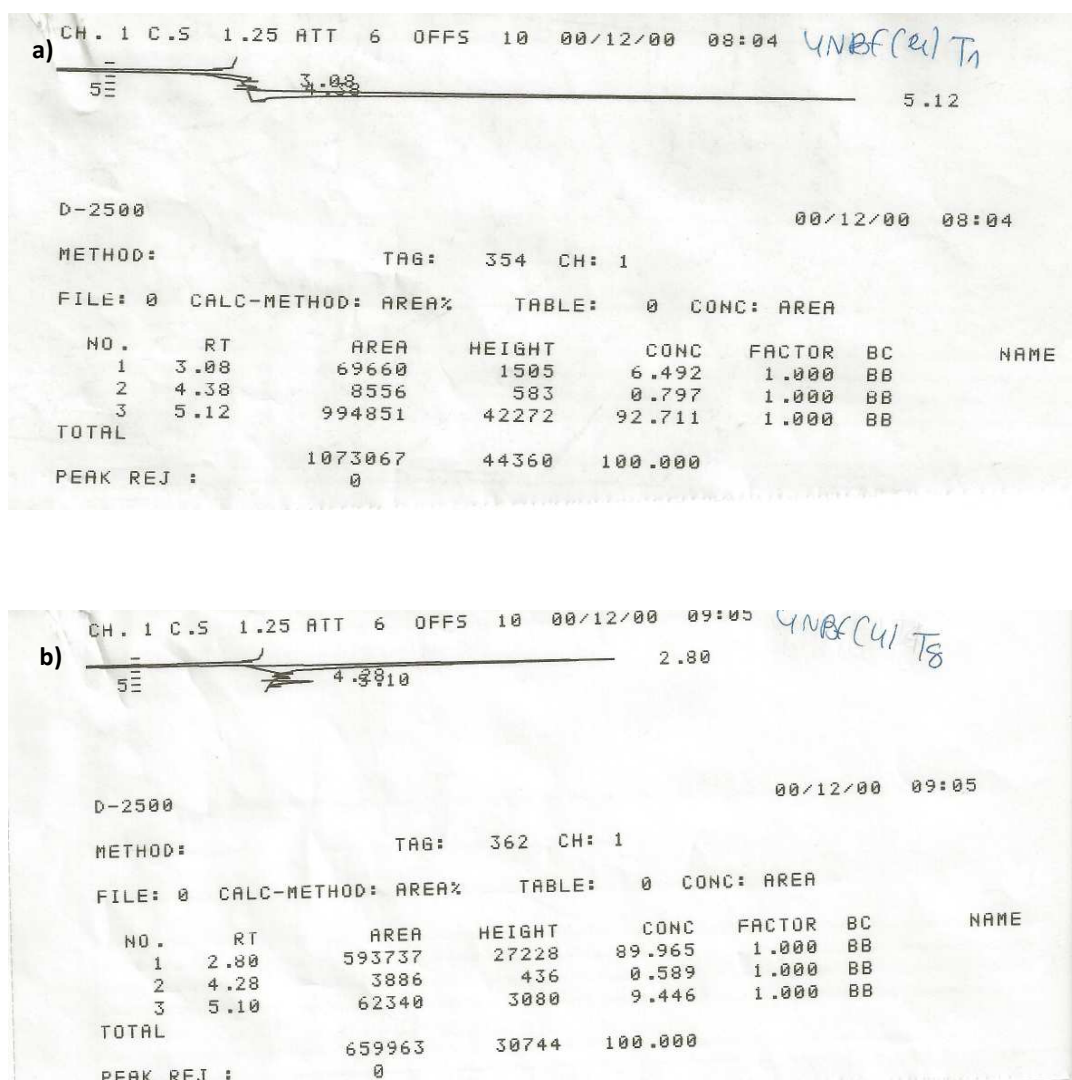


Figura 2.1- Cromatograma obtido por HPLC com o eluente 60%/40% Acetonitrilo/Fase aquosa com fluxo 1,0mL/min e detecção a 230nm. No início da hidrólise (a) e após a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (b). Tempo de retenção do éster: 5,10 min. Tempo de retenção do ácido: 2,80 min

2.4.1 - Estudos de estabilidade em tampão fosfato

Preparam-se duas soluções tampão com concentração total de 0,05M e força iônica 0,15M e valores de pH de 5,9 e 7,4 respetivamente conforme descrito no **Anexo I** sendo o pH final confirmado por medição no aparelho de pH.

O meio reacional continha tampão (pH 7,4 ou pH 5,9); 2% de acetonitrilo (ou 20% de acetonitrilo no caso dos compostos possuírem problemas de solubilidade), sendo adicionados os substratos a partir de soluções mãe de concentração igual a 10^{-1} M ou 10^{-2} M. Os volumes de cada componente são calculados partindo sempre de uma

concentração inicial de substrato no meio reacional de $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Foram-se retirando amostras de 50 μL ao longo do tempo que se diluíam de 1/10 com 450 μL de uma solução 1:1 água com acetonitrilo, sendo a concentração final a injetar no HPLC de $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

Além deste último método, também foi usado para alguns compostos, o método da injeção direta. Neste método, a composição do meio reacional é a mesma do método anterior, porém as reações de hidrólise processaram-se sempre partindo de uma concentração inicial de substrato de $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Em intervalos de tempo específicos foram retirados, 50 μL , usando uma seringa para injeção manual ou 500 μL colocados em recipientes para injeção automática.

2.4.2 - Estudos de estabilidade em plasma humano

2.4.2.1 - Obtenção do plasma humano

A recolha do sangue foi feita em heparinato de sódio, tendo sido centrifugado e recolhido o sobrenadante. Foi armazenado em recipientes de 2 mL e congelado a -20°C .

2.4.2.2 - Estabilidade em plasma humano

Estes estudos foram efectuados em suspensões de plasma humano diluído a 80% em tampão fosfato pH 7,4 de concentração total 0,05M e força iónica 0,15M à temperatura de 37°C . O meio reacional continha sempre 2% de acetonitrilo, sendo adicionadas quantidades de substratos a partir de soluções mãe de concentração igual a 10^{-1}M ou 10^{-2}M . As reações de hidrólise processaram-se sempre partindo de uma concentração inicial de substrato de $5 \times 10^{-4} \text{M}$.

O método utilizado foi semelhante ao usado para os estudos de estabilidade em tampão. Para cada composto, juntou num recipiente de 2mL: plasma (80% do volume total); tampão de pH =7,4; 2% ACN e uma alíquota da solução mãe (10^{-1} ou 10^{-2}M). Os volumes de cada componente são calculados de modo a ter sempre uma concentração inicial de substrato no meio reacional igual a $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Os ensaios foram incubados a uma temperatura de 37°C . A intervalos de tempo específicos, foram retiradas alíquotas de 50 μL que foram adicionadas a 450 μL de uma solução 1:1 de ACN: H_2O com 1%

(p/v) de sulfato de zinco ZnSO_4 , de modo a precipitar as proteínas plasmáticas sendo posteriormente centrifugadas a 15000 rotações por minuto durante 10 minutos e recolhidos os sobrenadantes os quais foram posteriormente analisados por HPLC.

2.4.3 - Hidrólise em homogenato de *Mycobacterium smegmatis*

2.4.3.1 - Preparação do homogenato de *M. smegmatis*

O *M. smegmatis* cresceu no meio de cultura Middlebrook 7H9 com OADC a $T=37^\circ\text{C}$ até se atingir na fase exponencial uma densidade ótica entre 0,8 e 1,0 no comprimento de onda de 600nm, tendo-se obtido um volume total de 2000mL. Retiraram-se porções de 200 mL de *M. smegmatis* para tubos de 200mL, que foram centrifugados a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos à temperatura de 4°C . Separou-se o resíduo do sobrenadante e adicionou-se 35 mL de tampão fosfato salino *PBS* pH = 7,4 a cada tubo, procedendo-se à sua lavagem. Efetuou-se nova centrifugação retirando-se o sobrenadante, tendo-se procedido a uma segunda lavagem do resíduo com nova solução de *PBS*. Os resíduos foram congelados e ressuspensos posteriormente com cerca de 25 μL de *PBS* (volume total ≈ 35 mL) sendo então colocados num banho com gelo no aparelho de ultra-sons aplicando-se 5 ciclos alternados, de 2 minutos intermitentes, seguidos de 2 minutos de descanso em cada tubo. Depois da preparação do homogenato, procedeu-se à determinação da concentração total de proteína do homogenato pelos métodos de Bradford e de Lowry. A concentração total de proteína assim obtida foi de 13,75 $\mu\text{g/mL}$.

Para estabelecer qual a percentagem deste homogenato a utilizar nos estudos de estabilidade subsequentes para os compostos a estudar, tomou-se a hidrólise do benzoato de etilo anteriormente descrita como padrão⁽⁴⁰⁾ sendo então estabelecido que a percentagem de homogenato a ser usada nos ensaios posteriores com os compostos em estudo deveria ser de 2%.

2.4.3.2 - Estabilidade em homogenato de micobactérias

Estes estudos foram efectuados em soluções de homogenato de micobactérias diluído a 2% em tampão fosfato pH = 7,4 de concentração total 0,05M e força iónica a 0,15M à temperatura de 37°C. O meio reacional continha sempre 2% de acetonitrilo, sendo adicionadas quantidades de substratos diluídas a partir de soluções mãe de concentração igual a 10^{-1} M. As reacções de hidrólise processaram-se sempre partindo de uma concentração inicial de substrato no meio reacional de 5×10^{-4} M.

O método utilizado foi semelhante ao usado para os estudos de estabilidade em tampão fosfato e em plasma humano. Para cada composto, juntou num recipiente de 2mL: tampão fosfato pH = 7,4, 2% homogenato, 2% ACN e uma alíquota da solução mãe (10^{-1} M). Os volumes de cada componente são calculados sempre para uma concentração de substrato inicial de 5×10^{-4} M no meio reacional. Os ensaios foram incubados a uma temperatura de 37°C. Em intervalos de tempo específicos, foram retiradas alíquotas de 50µL que foram adicionadas a 450µL de uma solução 1:1 de ACN: H₂O com 1% (p/v) de sulfato de zinco ZnSO₄, sendo posteriormente centrifugadas a 15000 rotações por minuto durante 10 minutos e recolhidos os sobrenadantes que foram posteriormente analisados por HPLC.

2.5 - Estudos de atividade dos ésteres derivados do ácido benzóico.

2.5.1- Estirpes bacterianas

Os estudos de atividade antimicobacteriana dos compostos estudados foram realizados com 3 estirpes de micobactérias:

- *Mycobacterium bovis* BCG (ATCC35734) adquirida do Instituto Pasteur.
- *Mycobacterium smegmatis* (mc²155) gentilmente cedida por Bill Jacobs.
- *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Institute Pasteur) (25177, ATCC).

2.5.2 - Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para o crescimento das estirpes em estudo foram:

- **Meio *Myco***

Preparam-se separadamente duas soluções - A e B. A solução A é preparada adicionando 5g do nutriente de Broth e 5g de D-glucose a 500mL de água desionizada. Por outro lado, a solução B é preparada adicionando 5g de *Middlebrook* 7H9 e 500μL de *Tween* 80 (ou de tiloxapol) a 500mL de água. As duas soluções vão à autoclave durante 10 min a 121°C, e depois no final misturadas.

- **Meio suplementado com *OADC***

Este meio é preparado adicionando 5g de *Middlebrook* 7H9 em 900mL de água, suplementado com 10% (v/v) *OADC*, 0,5% glicerol e 0.05% (v/v) *Tween* 80.

2.5.3 - Preparação das culturas de bactérias

Mycobacterium smegmatis

Em primeiro lugar é necessário preparar um inóculo, para ocorrer o arranque das bactérias. Este inóculo será preparado adicionando 1mL de bactérias+19mL de meio *Myco*. Além disso será também adicionado um antibiótico, (higromicina), diluída de 1/1000, ou seja na quantidade de 20 μL. Este inóculo prévio é deixado 24horas a incubar, à temperatura de 37°C e com agitação.

No dia seguinte, mede-se a densidade ótica DO do inóculo, utilizando duas *cuvettes* de 1,5 mL, uma contendo 1000μL de meio *Myco* (branco) e outra contendo 100μL bactérias+900μL meio *Myco*. Tendo-se obtido uma DO bastante grande, pelo que se prepararam dois inóculos com $DO_i = 0,025$ e $DO_i = 0,05$. Este inóculo foi deixado a incubar durante 12 horas, pois se esperava que ao fim deste período de tempo, se obtenha uma DO entre 0,5 e 1. Após as 12 horas, medem-se as DOs, e escolheu-se o inóculo com a DO, que se encontrava mais próxima da fase exponencial (0,5-1), o qual foi usado na preparação das placas.

BCG (Bacille Calmette-Guérin):

Em primeiro lugar é necessário preparar um inóculo, para ocorrer o arranque das bactérias. Este inóculo será preparado adicionando 1mL de bactérias+10mL de meio 7H9 OADC. Além disso será também adicionado um antibiótico (higromicina), diluída de 1/1000, ou seja na quantidade de 10 µL. Este inóculo prévio é deixado uma semana a incubar. Durante a semana de incubação, todos os dias, deve-se deixar o frasco que contém o inóculo aberto durante 10 segundos na câmara de fluxo, de modo a que as bactérias possam obter oxigénio, além disso, deve se agitar o frasco, para evitar a deposição de bactérias no fundo no frasco.

Após a semana de incubação, prepara-se um segundo inóculo a partir do anterior, adicionando 8mL bactérias+32 mL meio 7H9 OADC+ 40 µL higromicina num frasco de cultura. Como é aconselhável que cada frasco contenha cerca de 20mL, de modo a facilitar a agitação, o volume de 40mL será dividido por dois frascos. Este segundo inóculo ficará a incubar cerca de 3-5 dias, consoante a densidade de turvação apresentada, sendo também necessário, todos os dias, agitar os frascos e deixá-los abertos durante 10 segundos.

Mycobacterium tuberculosis H37Ra

Em primeiro lugar é necessário preparar um inóculo, para ocorrer o arranque das bactérias. Este inóculo será preparado adicionando 1mL de bactérias+10mL de meio 7H9 OADC. Além disso será também adicionado um antibiótico (higromicina), diluída de 1/1000, ou seja na quantidade de 10 µL. Este inóculo prévio é deixado uma semana a incubar. Durante a semana de incubação, todos os dias, deve-se deixar o frasco que contém o inóculo aberto durante 10 segundos na câmara de fluxo, de modo a que as bactérias possam obter oxigénio, além disso, deve se agitar o frasco, para evitar a deposição de bactérias no fundo no frasco.

Após a semana de incubação, prepara-se um segundo inóculo a partir do anterior, adicionando 8mL bactérias+32 mL meio 7H9 OADC+ 40 µL higromicina num frasco de cultura. Como é aconselhável que cada frasco contenha cerca de 20mL, de modo a facilitar a agitação, o volume de 40mL será dividido por dois frascos. Este segundo inóculo ficará a incubar cerca de 3-5 dias, consoante a densidade de turvação

apresentada, sendo também necessário, todos os dias, agitar os frascos e deixá-los abertos durante 10 segundos.

2.5.4 - Preparação dos inóculos para os estudos de atividade

O tratamento prévio consiste em retirar 30mL da cultura inicial para dois tubos de 50mL, colocando 15mL em cada um, procedendo-se em seguida a uma centrifugação de 4000rpm durante 10 minutos a 4°C, de modo a concentrar as bactérias. Após a centrifugação, retira-se o sobrenadante e ressuspende-se as bactérias em 1/3 do volume inicial de *Meio Myco* ou 7H9 a ambos os pHs a que se fizeram os estudos de atividade - 5,9 e 6,5. Para evitar a formação de agregados bacterianos (“*clamps*”), passa-se o inóculo por uma seringa de 10mL com agulha de 21G várias vezes. (No caso da BCG e da H37Ra, procedeu-se a uma lavagem com *PBS* antes de passar o inóculo pela seringa). De seguida coloca-se o inóculo no banho de ultrassons durante alguns minutos. Após esse período, procede-se a uma segunda centrifugação de 2000rpm durante 2 minutos e retira-se o sobrenadante. As bactérias são visualizadas através de microscopia de fluorescência, de modo a confirmar a formação de “*clamps*”. Caso esta não tenha ocorrido, determina-se a DO das bactérias em ambos os pHs. A cultura de bactérias final será preparada fazendo uma diluição, partindo de uma concentração correspondente a 10^7 unidades formadoras de colónias (UFC) bactérias/poço.

2.5.4.1 - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os compostos testados foram: benzoato de propilo (BP), benzoato de fenilo (BF), benzoato de hexilo (BH), 4-nitro benzoato de propilo (4NBP), 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF), 4-clorobenzoato de fenilo (4CIBF), 4-clorobenzoato de hexilo (4CIBH), 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP), 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF), 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH), 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dCIBP), 2,6-diclorobenzoato de fenilo (26dCIBF) e 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dCIBH). Para estes compostos foram preparadas soluções mãe em dimetilsufóxido (DMSO) de 10mg/mL e 20mg/mL.

A determinação das CMI é feita em placas de 96 poços, brancas, de fundo plano e com tampa. Os controlos usados foram: um controlo positivo DMSO com intervalo de concentrações igual ao dos compostos e dois controlos negativos kanamicina e meio. Os compostos foram testados com um intervalo de concentrações entre 800µg/mL-25µg/mL, usando o método das diluições seriadas, de modo a obter um volume final de 100µL (composto + DMSO). A cada poço com as várias concentrações são adicionados 100µL do inóculo 1×10^7 UFC ou 5×10^7 UFC, de modo a obter em cada poço a concentração de 1×10^5 UFC ou 5×10^5 , respetivamente.

As placas do branco têm por fim descontar os efeitos provocados pela precipitação dos compostos na leitura da densidade ótica das placas evitando assim o possível aparecimento de falsas leituras de densidade ótica, sendo a correção feita a partir da subtração dos valores de DO lidos nas placas que contêm os compostos pelos valores de DO lidos nestas placas para as mesmas concentrações.

As placas do branco são preparadas do mesmo modo que as placas onde é avaliada a determinação das atividades porém em vez de serem adicionados 100µL do inóculo das micobactérias, são adicionados 100µL de meio.

3 – ESTUDOS DE ESTABILIDADE E ATIVIDADE

3.1 – Estudos de estabilidade dos derivados do ácido benzóico

3.1- Estudos de estabilidade

A estabilidade dos ésteres derivados do ácido benzóico foi estudada em tampão fosfato pH = 5,9 e pH=7,4 e em plasma humano de modo a avaliar o comportamento destes pró-fármacos face à hidrólise tanto química como enzimática no organismo humano antes de atingirem as micobactérias. Além disso, pretende-se avaliar a contribuição da hidrólise química no processo de hidrólise enzimática. Os pró-fármacos têm de ser capazes de ultrapassar estas barreiras no organismo humano. Após estas serem ultrapassadas, os pró-fármacos serão internalizados pelas micobactérias, podendo ser ou não ativados por estas. Para avaliar esta ativação foram também realizados estudos de ativação em homogenato de micobactérias *M. smegmatis* (preparado como descrito no capítulo do Procedimento Experimental).

3.1.1 - Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em meio químico - tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9.

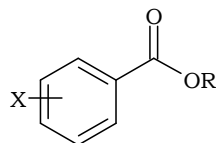
Para avaliar se os ésteres são capazes de resistir à hidrólise química, realizaram-se estudos de estabilidade a dois valores de pH 7,4 e 5,9. O objetivo do estudo da estabilidade a pH 7,4 é a posterior comparação com a hidrólise enzimática em meio biológico, uma vez que nos ensaios biológicos os meios são diluídos em tampão fosfato a este pH. Os estudos de estabilidade foram também realizados a pH 5,9, uma vez que também se estudou a atividade *in vitro* destes compostos nas micobactérias a este pH, e pretende-se também determinar a estabilidade dos pró-fármacos a este pH. Este estudo permite avaliar a estabilidade dos compostos em estudo no interior dos fagolisossomas, uma vez que estes possuem um pH ácido.

Em alguns dos ensaios realizados não foi possível observar o aparecimento do ácido, pelo que foram realizados ensaios posteriores nas mesmas condições, em que o substrato foi o ácido. Os resultados são apresentados no Anexo IV. A partir destas figuras é possível concluir que o ácido 2,6-diclorobenzóico apresenta grande estabilidade durante 200 horas. O ácido benzóico apresenta um tempo de semi-vida de 131 horas. No caso do ácido 3,5-dinitrobenzóico observa-se o seu desaparecimento com um tempo de semi-vida de cerca de 216 horas. De um modo geral observa-se que os ácidos apresentam uma grande estabilidade durante um grande período de tempo.

Assim, uma explicação para o facto de por vezes não se conseguir observar o aparecimento do ácido pode ser um problema de solubilidade do pró-fármaco éster, pelo que usou uma percentagem de acetonitrilo de 20%, de modo a tentar melhorar a solubilidade dos compostos. Estudos anteriores demonstraram que a hidrólise dos compostos é mais lenta com maior percentagem de solvente orgânico (acetonitrilo) utilizada, assim os correspondentes tempos de semi-vida serão maiores caso se usasse a percentagem de 20% ACN comparativamente com 2% ACN.⁽¹⁰²⁾ Para os compostos em que não se observou o aparecimento simultâneo do ácido com o desaparecimento do éster utilizou-se uma percentagem de 20% de ACN nos estudos de estabilidade em tampão fosfato, tendo-se assim conseguido observar o aparecimento do ácido.

Assim foram determinadas as constantes de *pseudo*-primeira ordem para a hidrólise dos pró-fármacos em estudo, k_{obs} , e partir destas os correspondentes tempos de semi-vida ($t_{1/2}$). A Tabela 3.1.1 mostra os resultados dos estudos de estabilidade em tampão em 2% ACN e a Tabela 3.1.2 mostra os resultados dos estudos de estabilidade em tampão em 20% ACN:

Tabela 3.1.1- Constantes de *pseudo*-primeira ordem e tempos de semi-vida para as hidrólises dos ésteres derivados do ácido benzóico em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9 ($C_i = 0,05M$ e $I=0,15M$). Os ensaios foram realizados em triplicado a $T=37^\circ C$, com 2% acetonitrilo e com $C_i=5\times 10^{-4}M$.



Composto	X	R	Tampão pH=7,4		Tampão pH=5,9	
			$10^2 \times k_{obs}/h^{-1}$	$t_{1/2}/h$	$10^2 \times k_{obs}/h^{-1}$	$t_{1/2}/h$
BP	H	-C ₃ H ₇	37±0,37	1,9±0,019	22,5±2,1	3,1±0,3
BF	H	-C ₆ H ₅	25,2±3	2,8±0,3	32±0,63	2,2±0,04
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	1,9±0,3	38±6,3	0,28±0,01	249±9
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	(26±1,2)×10 ⁻²	270±12	(56±1,2)×10 ⁻² ¹	123±2,6
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	0,74±0,06	96±6,9	(19±0,14)×10 ⁻² **	367±2,7**
4ClBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	(97±0,6)×10 ⁻²	71±0,6	2,4±0,01 ¹	29±0,12
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	2,3±0,17	30±2,4	(333±0,6)×10 ⁻²	21±0,04
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	2,83±0,06	25±0,49	1,01±0,01	69±0,68

(**) - por estimativa ao fim de cerca de 300 horas

Tabela 3.1.2- Constantes de *pseudo*-primeira ordem e tempos de semi-vida para as hidrólises dos ésteres derivados do ácido benzóico em tampão fosfato pH 7,4 e pH 5,9 ($C_i = 0,05M$ e $I=0,15M$). Os ensaios foram realizados em triplicado a $T=37^\circ C$, com 20% acetonitrilo e com $C_i=5\times 10^{-4}M$.

Composto	X	R	Tampão pH=7,4		Tampão pH=5,9	
			$10^2 \times k_{obs}/h^{-1}$	$t_{1/2}/h$	$10^2 \times k_{obs}/h^{-1}$	$t_{1/2}/h$
BH	H	-C ₆ H ₁₃	0,48±0,01	144±4	0,31±0,07	228±46
4ClBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	0,37±0,03	188±12,9	0,39±0,03**	179±15**
4ClBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	1,4±0,08	49±3	0,85±0,08	82±7,6
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	0,36±0,12	208±68	0,35±0,04**	199±19**
26dClBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	(76±0,6)×10 ⁻²	87±0,63	(51±0,6)×10 ⁻²	135±1,5
26dClBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	(13±0,3)×10 ⁻² **	546±11**	(30±1,5)×10 ⁻² **	229±11**
26dClBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	(120±1,5)×10 ⁻² *	57±0,70*	0,3±0,03**	232±20**

(*) - ao fim de 2 meias vidas (**) - por estimativa ao fim de cerca de 300 horas

Analisando os resultados da Tabela 3.1.1, observa-se que os valores de k_{obs} se situam entre $(26 \pm 1,2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, para o **35dNBF** e $37 \pm 0,37 \text{ h}^{-1}$ para **BP**, a pH 7,4 e entre $(19 \pm 0,14) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o **35dNBH**, e $32 \pm 0,63 \text{ h}^{-1}$ para **BF**, a pH 5,9. De uma maneira geral observa-se que os ésteres apresentaram hidrólises lentas tanto em tampão pH 7,4 como em tampão pH 5,9.

A partir dos resultados obtidos, não é possível estabelecer nenhuma relação entre variação da cadeia alcoólica e os valores de k_{obs} , nem estabelecer qualquer relação entre os valores de k_{obs} e os valores de pH. Deste modo, a hidrólise química a ambos os pH irá depender da estrutura da molécula.

A evolução das percentagens de espécies ao longo da reação de hidrólise para os vários ésteres estudados encontra-se no Anexo III. No entanto, apresentam-se seguidamente alguns dos ensaios, a título de exemplo:

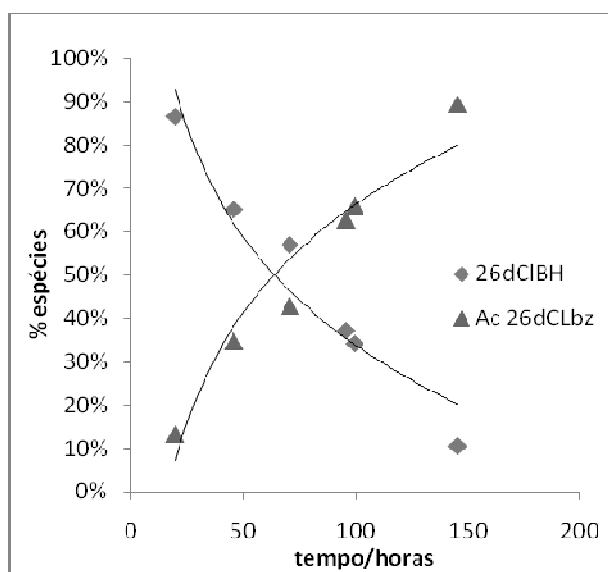


Figura 3.1.1 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato pH 7,4 para o composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dClBH).

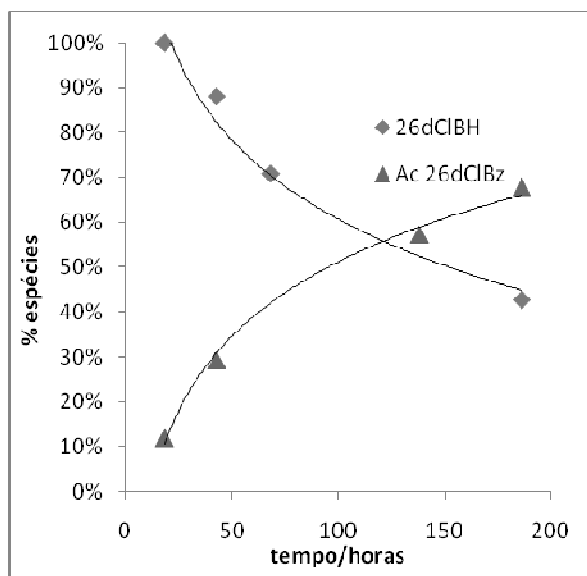


Figura 3.1.2 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato pH 5,9 para o composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dClBH).

3.1.2 Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em meios biológicos

Conforme já referido anteriormente, um dos objetivos do nosso estudo é desenvolver pró-fármacos que sejam suficientemente resistentes à hidrólise pelos esterases existentes no plasma humano, mas que ao chegaram ao local de ação - micobactérias se possam converter na sua forma ativa, exercendo o seu efeito. Com este objetivo em mente, foram efetuados estudos da estabilidade dos ésteres derivados do ácido benzóico em plasma humano e em homogenato de micobactérias, de modo a selecionar os compostos que melhor alcançam este objetivo.

3.1.2.1 Estudo da estabilidade dos derivados do ácido benzóico em plasma humano

A estabilidade em plasma humano permite avaliar a hidrólise enzimática pelos esterases do plasma humano. Assim, é necessário que os pró-fármacos estudados sejam suficientemente estáveis face às esterases do plasma humano, de modo a conseguirem chegar ao seu local de ação, *M. tuberculosis*, e possam ser convertidos nos fármacos ativos, pelos esterases das micobactérias.

O comportamento dos ésteres foi estudado em plasma humano a 80% em tampão fosfato a pH =7,4, de concentração 0,05M e força iónica a 0,15M. Todos os ensaios foram realizados com uma percentagem de ACN de 2%, à temperatura de 37°C e com concentração inicial do composto no meio reacional de 5×10^{-4} M como descrito no capítulo do Procedimento Experimental.

Em todos os estudos de estabilidade em plasma foi possível observar o aparecimento do ácido em simultâneo com o desaparecimento do éster. Apresenta-se seguidamente a evolução das percentagens de espécies ao longo da reação de hidrólise em plasma humano para os vários ésteres estudados - Figuras 3.1.3 - 3.1.16:

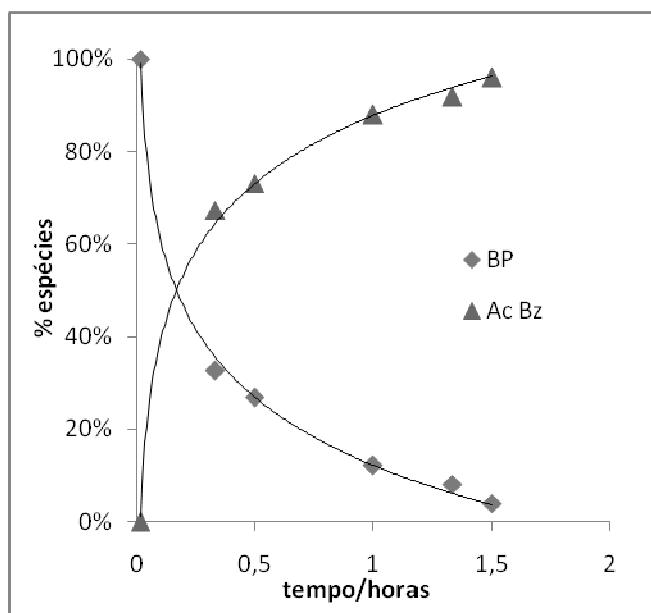


Figura 3.1.3 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de propilo (BP) em plasma humano.

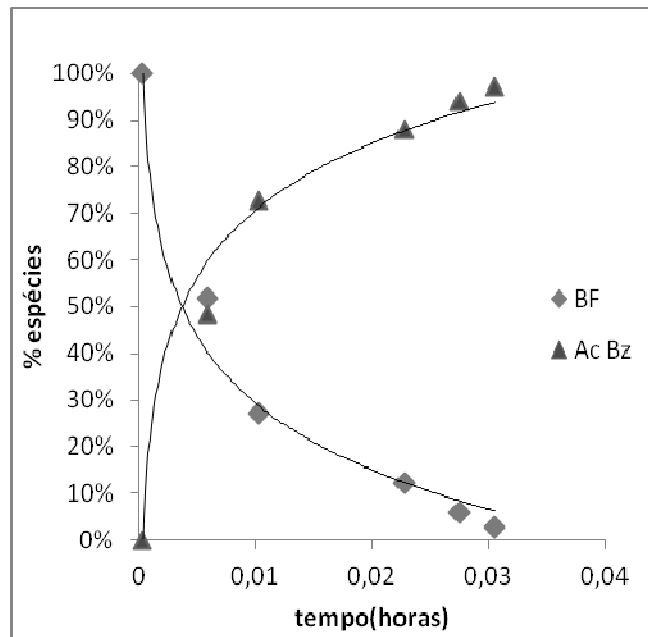


Figura 3.1.4 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de fenilo (BF) em plasma humano.

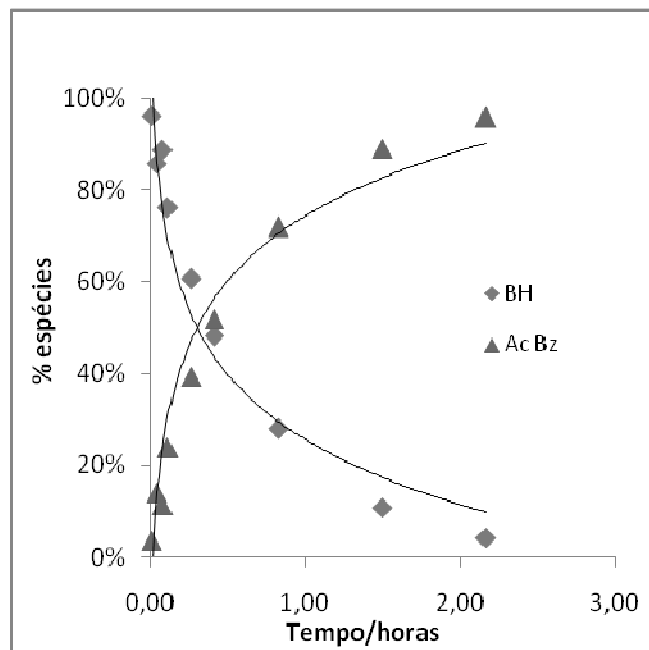


Figura 3.1.5 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto benzoato de hexilo (BH) em plasma humano.

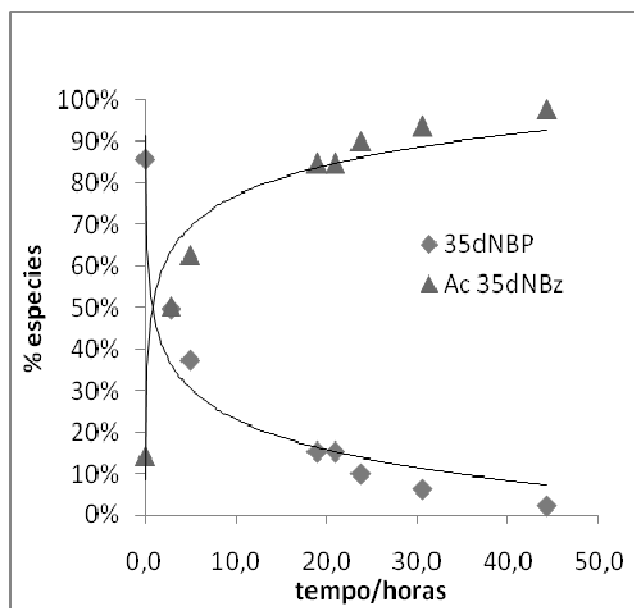


Figura 3.1.6 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP) em plasma humano.

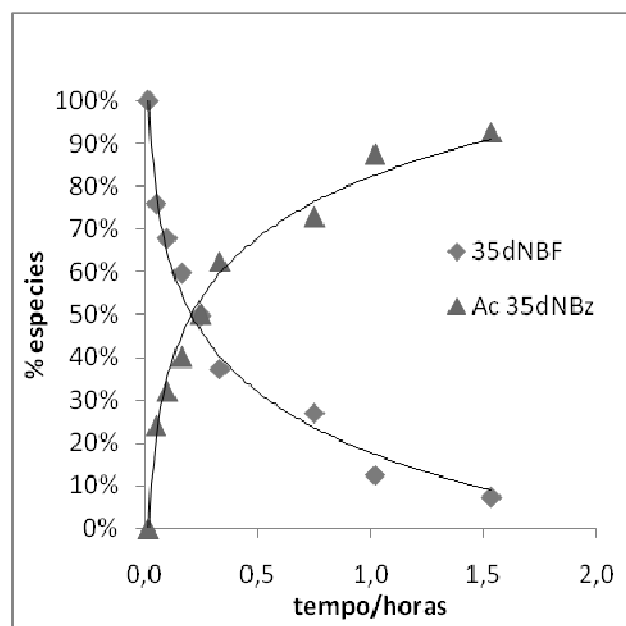


Figura 3.1.7 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF) em plasma humano.

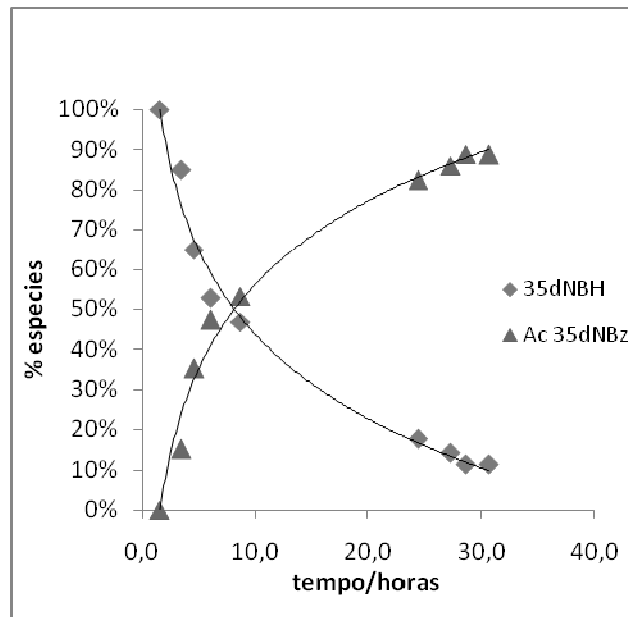


Figura 3.1.8 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH) em plasma humano.

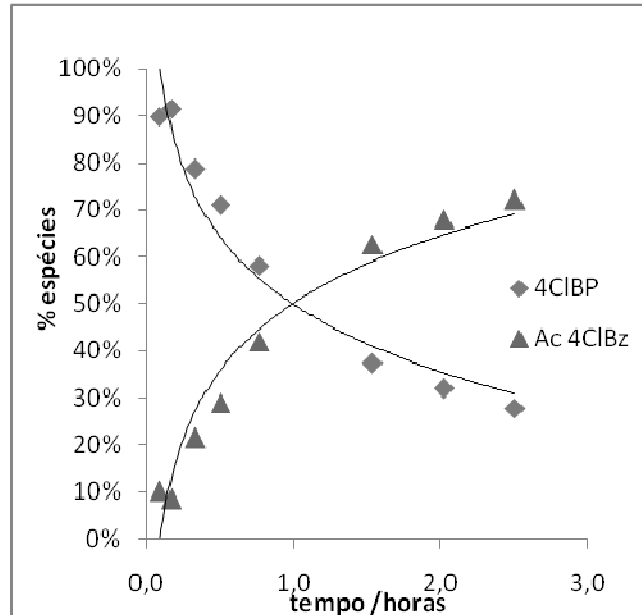


Figura 3.1.9 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de propilo (4ClBP) em plasma humano.

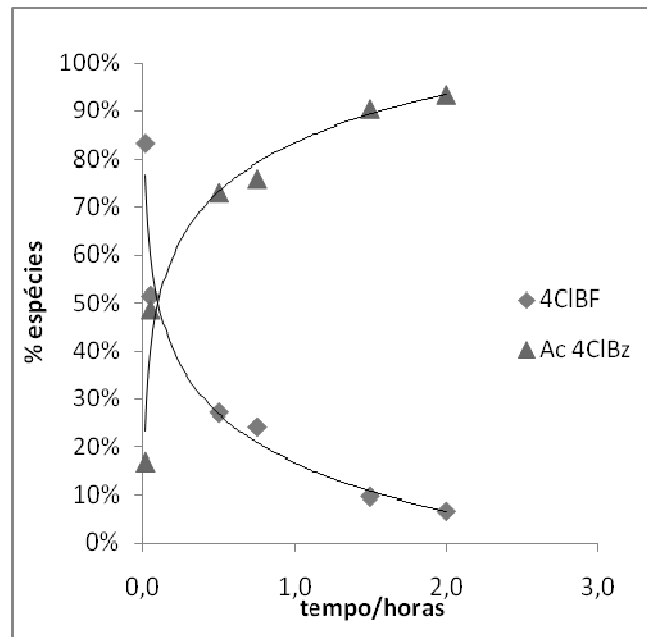


Figura 3.1.10 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de fenilo (4CIBF) em plasma humano.

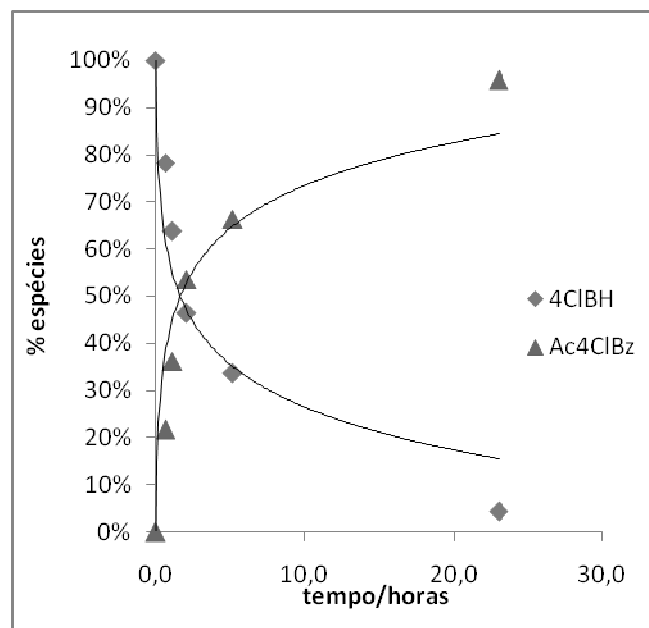


Figura 3.1.11 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-clorobenzoato de hexilo (4CIBH) em plasma humano.

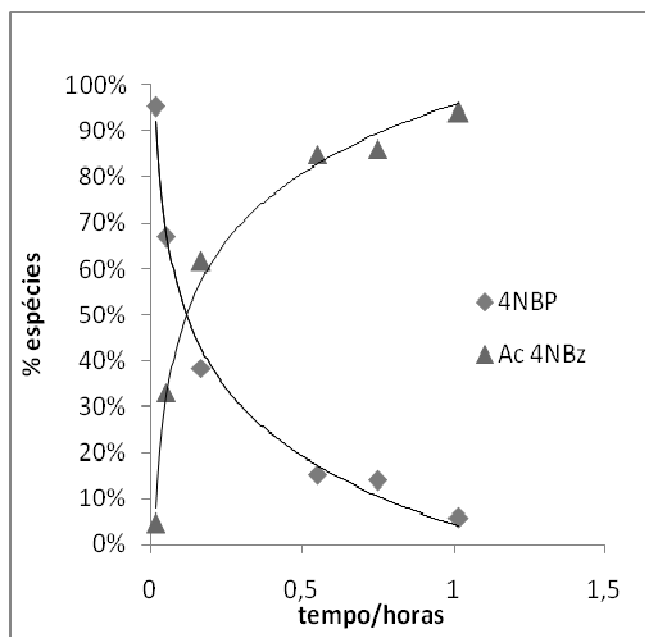


Figura 3.1.12 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de propilo (4NBP) em plasma humano.

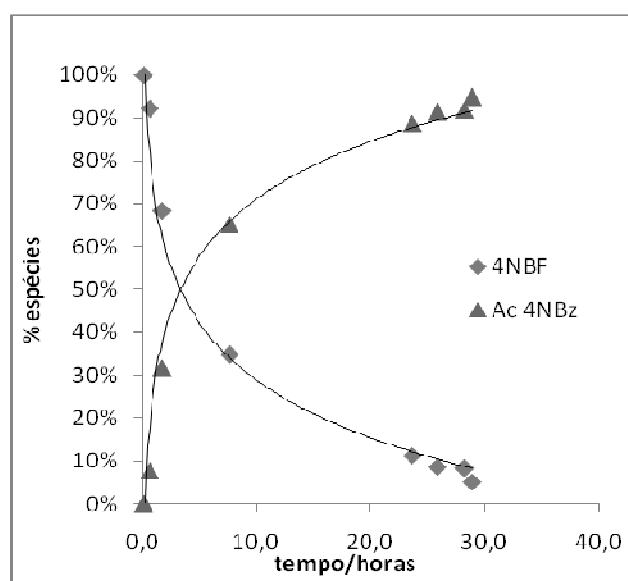


Figura 3.1.13 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF) em plasma humano.

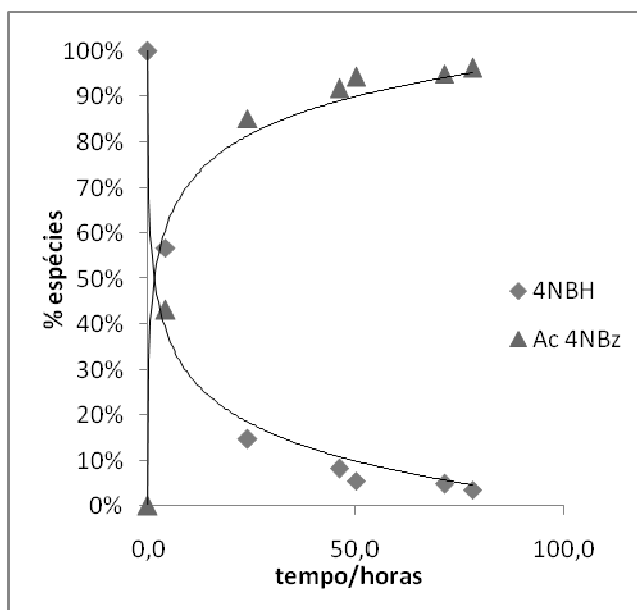


Figura 3.1.14 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 4-nitrobenzoato de hexilo (4NBH) em plasma humano.

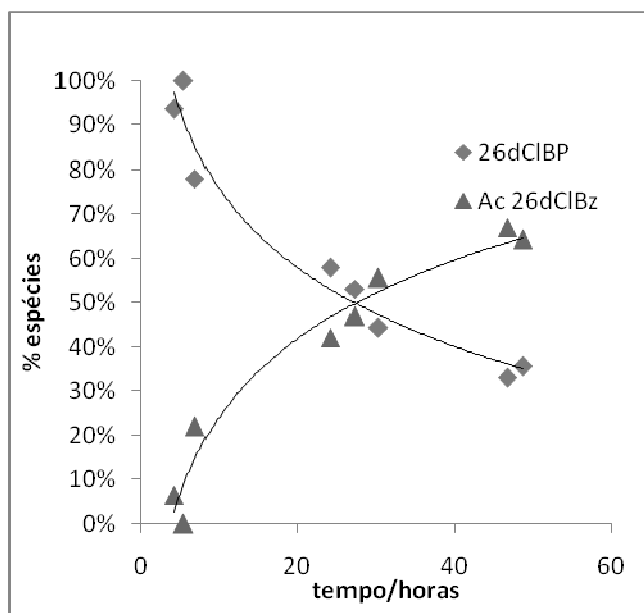


Figura 3.1.15 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dClBP) em plasma humano.

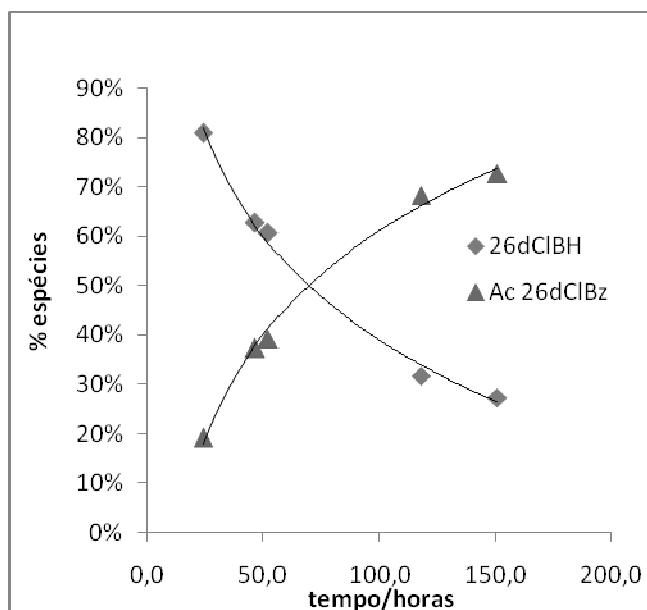
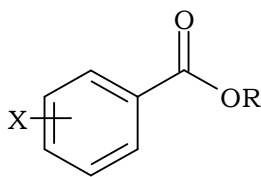


Figura 3.1.16 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a hidrólise do composto 2,6-diclorobenzoato de hexilo (26dClBH) em plasma humano.

De modo, a tirar conclusões sobre a estabilidade dos ésteres estudados no plasma humano, foram determinadas as constantes de *pseudo*-primeira ordem, k_{obs} , e partir destas os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). Além disso, compararam-se as constantes de *pseudo*-primeira ordem obtidas em tampão fosfato pH = 7,4 - Tabela 3.1.1 - com as constantes obtidas em plasma humano de modo a determinar qual a contribuição da hidrólise química na hidrólise enzimática. Estes resultados encontram-se na Tabela 3.1.3.

Tabela 3.1.3- Hidrólise dos ésteres derivados do ácido benzóico em plasma humano a 80% em tampão fosfato pH = 7,4. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, com 2% de ACN, à temperatura de 37°C e com concentração inicial de substrato de 5×10^{-4} M.



Composto	X	R	80% Plasma		$k_{\text{obsplasma}} / k_{\text{obstampão 7,4}}$
			$k_{\text{obs}}/\text{h}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$	
BP	H	-C ₃ H ₇	2,03±0,58	0,37±0,14	5,5
BF	H	-C ₆ H ₅	78,6±0,68	$(8,8 \pm 0,083) \times 10^{-3}$	312
BH	H	-C ₆ H ₁₃	1,10±0,05	0,63±0,03	—
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	$(5,7 \pm 0,15) \times 10^{-2}$	12,2±0,33	3
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	1,47±0,021	0,47±0,007	565
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	$(5,0 \pm 0,81) \times 10^{-2}$	14,2±2,4	6,8
4CIBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	0,64±0,01	1,08±0,017	—
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	1,26±0,05	0,55±0,02	129
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	$(24 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	2,9±0,07	—
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	2,08±0,22	0,34±0,035	90
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	$(6,5 \pm 0,25) \times 10^{-2}$	10,6±0,4	2,3
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	$(2,5 \pm 0,025) \times 10^{-2}$	27,7±0,28	—
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	42,2±2,5	—
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	$(7,08 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	97,9±1,5	—
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	$(2,4 \pm 0,15) \times 10^{-2*}$	29±1,8*	—

(*) - ao fim de 2 meias vidas

Numa primeira análise, observa-se em todos os compostos, que os valores de k_{obs} para a hidrólise em plasma são maiores do que os valores de k_{obs} para hidrólise química, variando as razões $k_{\text{obsplasma}} / k_{\text{obstampão 7,4}}$ entre 2 e 565. Com bases nesses resultados, é possível concluir que a hidrólise em plasma é muito mais rápida do que a hidrólise em tampão fosfato.

Em relação às velocidades de hidrólise, observa-se que os compostos com os substituintes 2,6-dicloro no grupo aciloxílico, são aqueles que apresentam maior estabilidade, uma vez que apresentam valores de k_{obs} mais baixos. O composto mais estável é o **26dCIBF** - $t_{1/2} = (97,9 \pm 1,5)$ h, seguido do **26dCIBP** - $t_{1/2} = (42,2 \pm 2,5)$ h - e do **26dCIBH** - $t_{1/2} = (29 \pm 1,8)$ h. Por outro lado, o composto mais susceptível à hidrólise é o **BF** com um $t_{1/2}$ de $(31,7 \pm 0,3)$ s. Deste modo observa-se que os compostos com o substituinte 2,6-dicloro são os que apresentam as hidrólises mais lentas e os compostos sem qualquer substituinte apresentam as hidrólises mais rápidas.

Além disso, pode-se constatar que a introdução de cadeias lineares ou aromáticas no éster influencia a velocidade de hidrólise. A partir da análise dos resultados da Tabela 3.1.3 observa-se que para o mesmo grupo aciloxílico, variações na cadeia alcóxilo provocam alterações no tempo de meia-vida. Assim, os tempos de meia vida variam de acordo com a seguinte ordem: cadeia fenólica < cadeia propílica < cadeia hexílica. De uma maneira geral, observa-se que a introdução do grupo aromático na cadeia alcóxílica nos ésteres correspondentes leva um aumento nos k_{obs} , e consequente diminuição do $t_{1/2}$, em virtude do grupo fenol ser um bom grupo abandonante ($pK_a = 9,90$). No caso da introdução de uma cadeia hexílica, observa-se uma diminuição considerável nos k_{obs} , o que parece indicar que a introdução de cadeias alcóxílicas grandes parece aumentar a lipofilia, o que consequentemente irá conduzir ao aumento da estabilidade em plasma.

Também a introdução de grupos eletroatratores ou eletrodoadores na cadeia porção aciloxílica do éster bem como a sua posição no anel aromático pode influenciar as velocidades de hidrólise dos ésteres em estudo. Assim, a introdução de grupos eletroatratores, como o grupo cloro e o grupo nitro, diminuem a velocidade de hidrólise, uma vez que desativam o anel aromático porém através de efeitos diferentes. O grupo nitro desativa o anel, através do efeito de ressonância, atraindo os eletrões do anel para si, criando uma carga positiva em carbonos na vizinhança do carbono carbonílico dificultando deste modo a hidrólise. Por outro lado, o grupo cloro desativa o anel por efeito indutivo, no entanto este efeito não é tão evidente - desativante fraco, quanto o efeito de ressonância produzido pelo grupo nitro que é um desativante forte. Isto explica o facto dos benzoatos com substituintes cloro apresentarem $t_{1/2}$ entre as 0,55 horas e as 97,9 horas, enquanto os benzoatos com substituintes nitro apresentam $t_{1/2}$ entre as 0,34

horas e as 14,2 horas, de um modo geral superiores aos benzoatos não substituídos na porção aciloxílica.

Também parece existir uma relação entre as velocidades de hidrólise e a posição em que o substituinte se encontra na porção aciloxílica do éster. A introdução de grupos halogéneos, como o cloro leva a uma redução da densidade eletrónica no anel aromático por efeito indutivo. Quando o grupo cloro é introduzido na posição 4 do anel aromático a velocidade de hidrólise é maior do que quando este grupo é inserido nas posições 2 e 6. Por exemplo, para a cadeia propílica, o $t_{1/2}$ do **4ClBP** é 1,08 horas, sendo o $t_{1/2}$ do **26dClBP** de 42,2 horas. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de na posição 4, o efeito indutivo ser apenas exercido por um grupo cloro, enquanto nas posições 2 e 6, este será mais intenso, uma vez que é exercido por dois grupos cloro, no entanto, nas posições 2 e 6, além do efeito indutivo, existe também um forte impedimento estereoquímico pelos grupos cloro adjacentes ao carbono carbonílico, o que irá dificultar o processo de hidrólise - Figura 3.1.17.

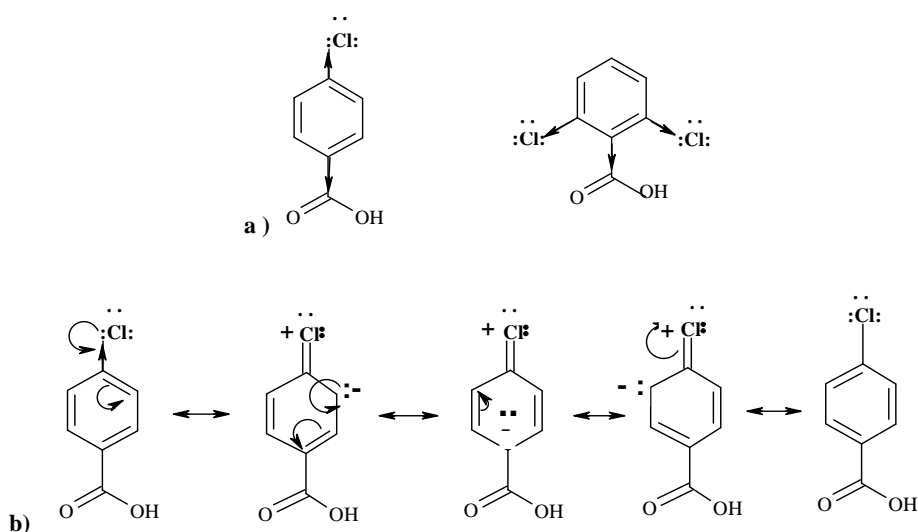


Figura 3.1.17- Representação do efeito indutivo nos grupos cloro na posição 4 e nas posições 2,6 da porção aciloxílica no anel aromático (a) e do efeito de ressonância do grupo cloro na posição 4 no anel aromático (b).

Também são observadas diferenças, no caso dos grupos nitro estarem na posição 3 e 5 ou na posição 4. Por exemplo, para a cadeia propílica, o $t_{1/2}$ do **4NBP** é 0,34 horas, sendo o $t_{1/2}$ do **35dNBP** de 12,2 horas. Esta diferença pode ser explicada pelo facto do efeito de ressonância gerado pelo grupo nitro na posição 4 ser mais fraco, uma vez que é influenciado apenas por um grupo nitro enquanto na posição 3,5 é influenciado por dois

grupos nitro, o que aumenta a capacidade do grupo nitro para captar eletrões, desativando o carbono carbonílico e dificultando deste modo a hidrólise -Figura 3.1.4.
(47)

3.1.2.2 - Estudo da ativação dos ésteres derivados do ácido benzóico em homogenato de micobactérias

Além de estudar a estabilidade dos ésteres em plasma humano, foi também estudada a sua ativação em homogenato de micobactérias. Estes estudos são importantes, na medida que a hidrólise pelos esterases das micobactérias é essencial para a ativação intracelular aos ácidos carboxílicos correspondentes. Após resistirem à hidrólise pelos esterases do plasma, os pró-fármacos serão internalizados pelas micobactérias, portanto seria desejável que estes sejam facilmente ativados pelos esterases das micobactérias.

Para estudar a estabilidade dos ésteres nos esterases das micobactérias, usou-se o homogenato total de *Mycobacterium smegmatis*, que foi preparado, conforme descrito no Procedimento Experimental. Estes estudos foram efectuados em homogenato total de micobactérias num percentagem de 2% em tampão fosfato de concentração total de 0,05M e força iónica de 0,15M a pH = 7,4. Todos os ensaios foram realizados com uma percentagem de ACN de 2%, à temperatura de 37°C e com concentração inicial do éster no meio reacional de 5×10^{-4} M.

É ainda de salientar que em todos os estudos de estabilidade em homogenato de micobactérias, foi possível observar que o desaparecimento do éster corresponde ao aparecimento do ácido. De seguida, apresentam-se a evolução das percentagens de espécies ao longo do processo de ativação para os vários ésteres estudados - Figuras 3.1.18 -3.1.29:

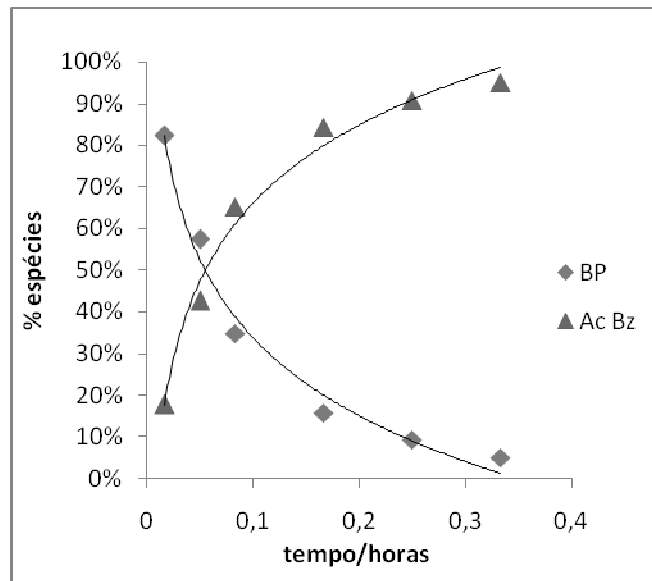


Figura 3.1.18 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de propilo (BP) em homogenato de micobactérias.

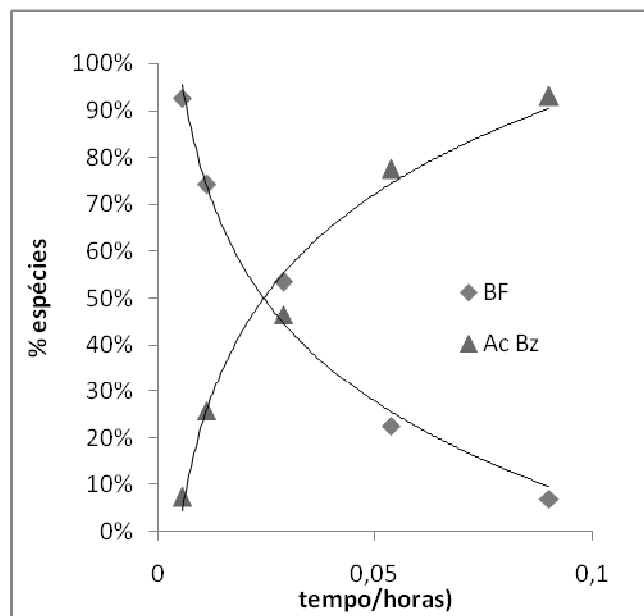


Figura 3.1.19 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de fenilo (BF) em homogenato de micobactérias.

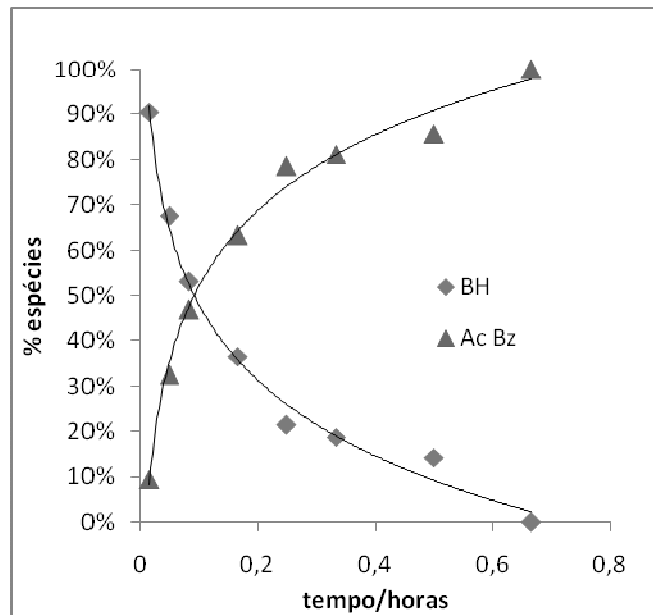


Figura 3.1.20 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto benzoato de hexilo (BH) em homogenato de micobactérias.

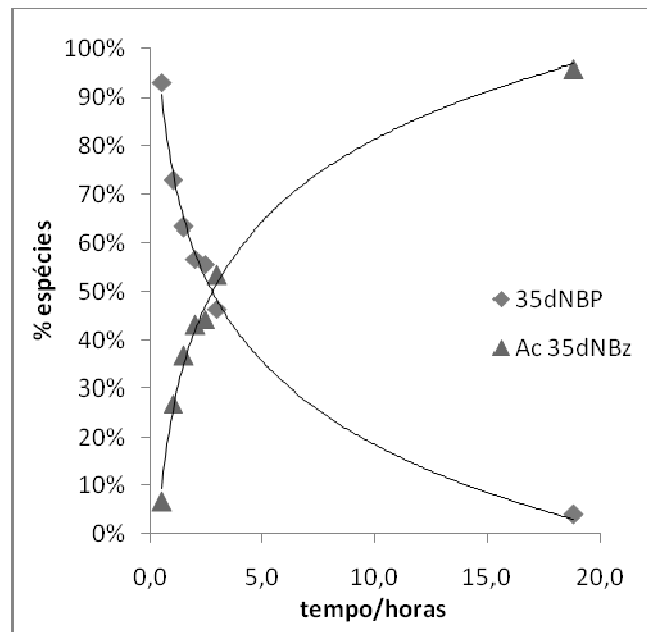


Figura 3.1.21 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de propilo (35dNBP) em homogenato de micobactérias.

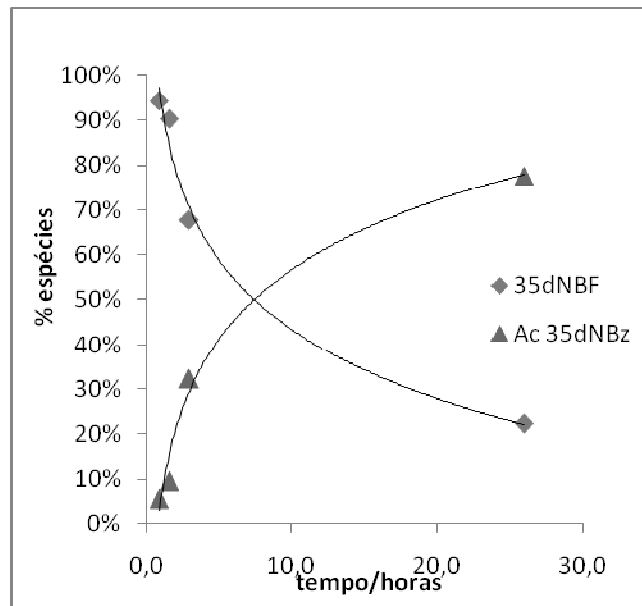


Figura 3.1.22 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de fenilo (35dNBF) em homogenato de micobactérias.

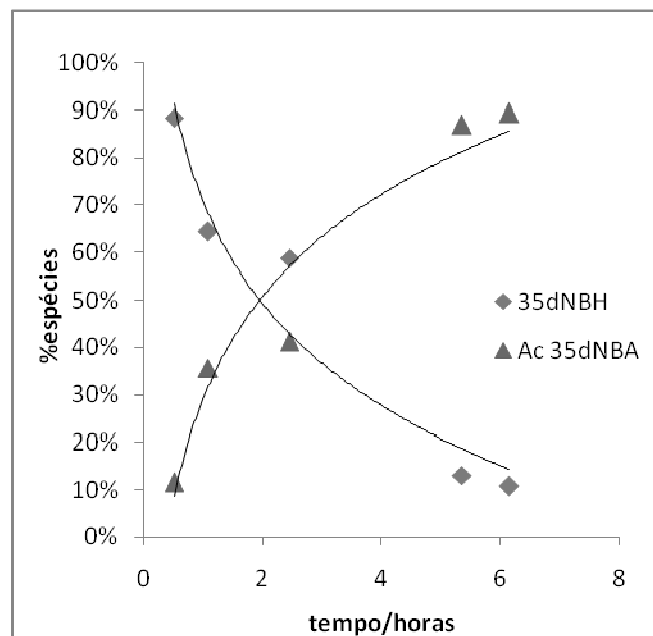


Figura 3.1.23 - Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (35dNBH) em homogenato de micobactérias.

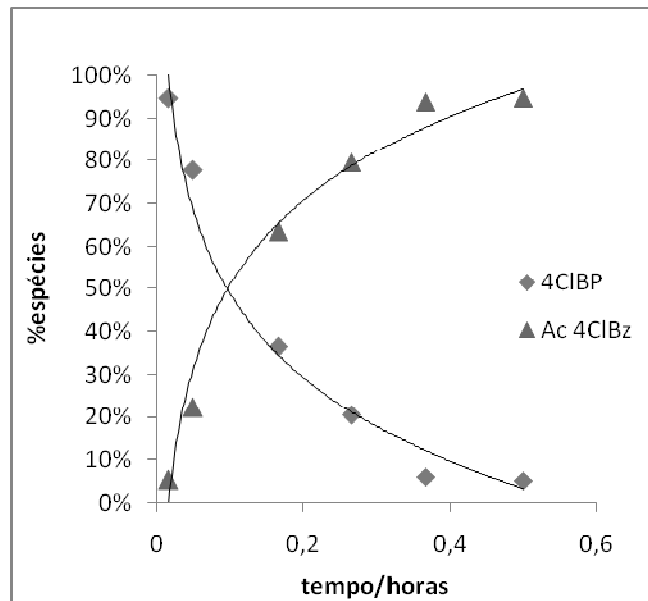


Figura 3.1.24 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-clorobenzoato de propilo (4CIBP) em homogenato de micobactérias.

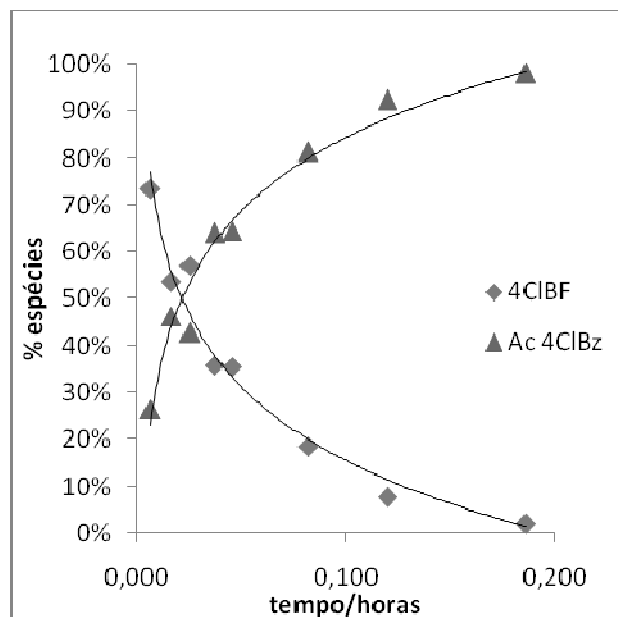


Figura 3.1.25 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-clorobenzoato de fenilo (4CIBF) em homogenato de micobactérias.

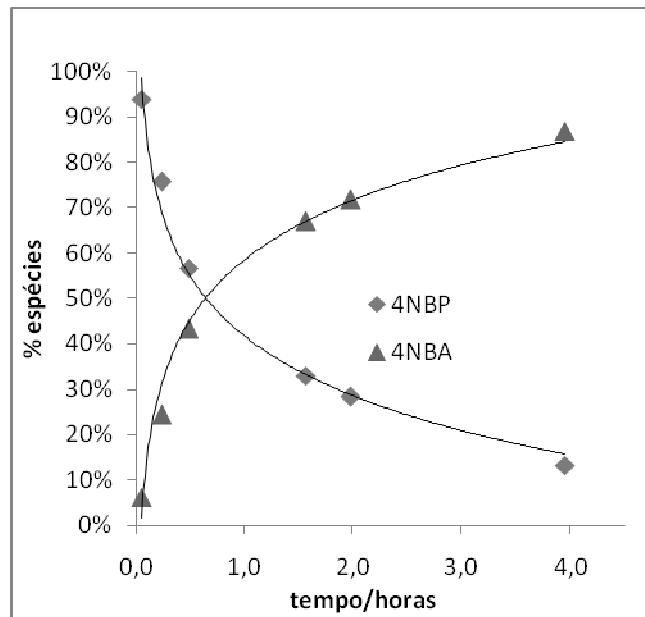


Figura 3.1.26 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de propilo (4NBP) em homogenato de micobactérias.

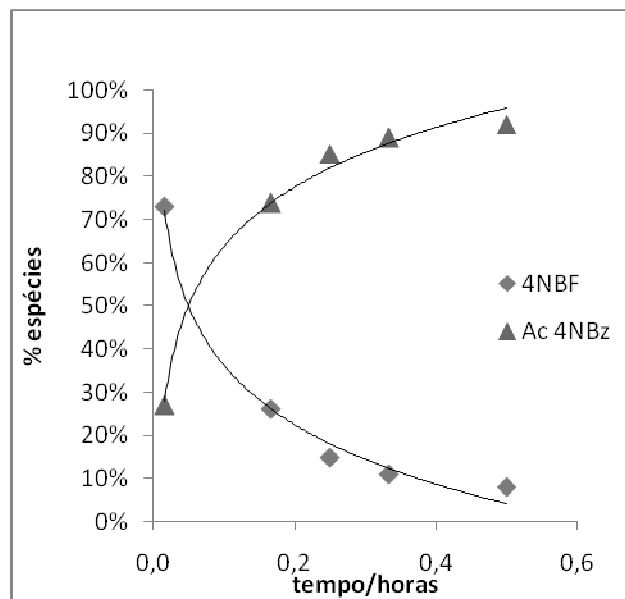


Figura 3.1.27 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de fenilo (4NBF) em homogenato de micobactérias.

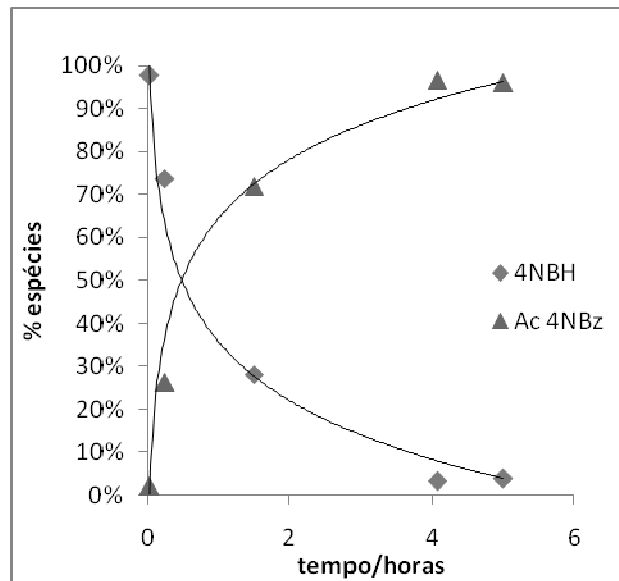


Figura 3.1.28 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 4-nitrobenzoato de hexilo (4NBH) em homogenato de micobactérias.

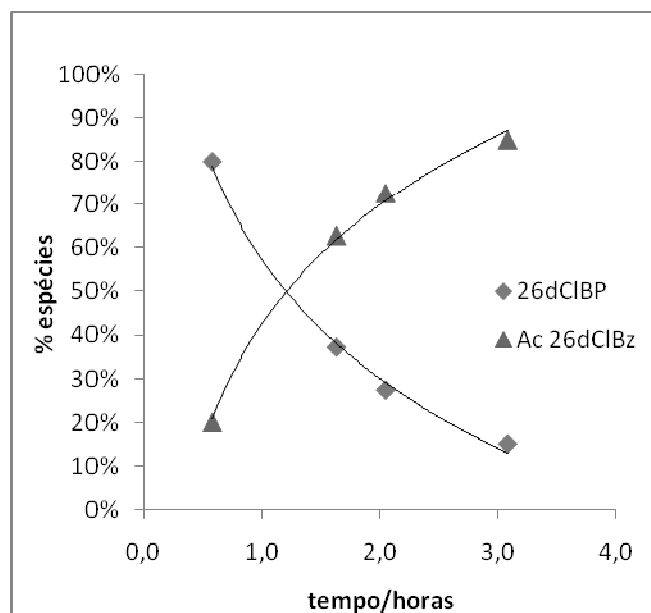
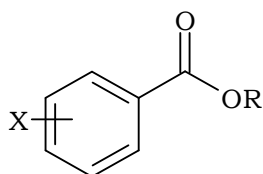


Figura 3.1.29 - Evolução da porcentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo para a ativação do composto 2,6-diclorobenzoato de propilo (26dClBP) em homogenato de micobactérias.

Para tirar conclusões sobre a velocidade de desaparecimento dos ésteres estudados no homogenato de micobactérias, foram determinadas as constantes de *pseudo*-primeira ordem para a hidrólise, k_{obs} , e partir destas os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). Além disso, compararam-se as constantes de *pseudo*-primeira ordem obtidas em tampão fosfato pH = 7,4 com as constantes obtidas em homogenato de micobactérias. Estes resultados encontram-se na Tabela 3.1.4:

Tabela 3.1.4- Hidrólise dos ésteres derivados do ácido benzóico em homogenato de micobactérias a 2% em tampão fosfato 7,4 (Ct=0,05M, I=0,15M). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, com 2% de ACN, à temperatura de 37°C e com concentração inicial de substrato de 5×10^{-4} M.



Composto	X	R	Homogenato <i>M. smegmatis</i>	
			k_{obs}/h^{-1}	$t_{1/2}/h$
BP	H	-C ₃ H ₇	7,8±0,34	0,084±0,004
BF	H	-C ₆ H ₅	27±1,1	(26±1)×10 ⁻³
BH	H	-C ₆ H ₁₃	3,4±0,09	0,21±0,005
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,32±0,005	2,2±0,03
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	(5,3±0,6)×10 ⁻³	13±0,15
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	0,28±0,007	2,5±0,06
4CIBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	4,9±0,38	0,14±0,01
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	13±0,46	0,054±0,002
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	4,05±0,10	0,17±0,004
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,48±0,02	1,5±0,06
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,43±0,01	1,6±0,05
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	0,59±0,05	1,20±0,095
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	0,63±0,004	1,10±0,006
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	0,57±0,006	1,20±0,012
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	0,46±0,02	1,5±0,05

A partir da Tabela 3.1.4, é possível observar que os tempos de semi-vida $t_{1/2}$ variam entre 0,089 h e 2,5 h. Quanto às velocidades de ativação, observa-se que os compostos com os substituintes 3,5-dinitro no grupo aciloxílico são aqueles que apresentam maior estabilidade, uma vez que apresentam valores de k_{obs} mais baixos. O composto mais estável é o **35dNBF** - $t_{1/2} = (13 \pm 0,15)$ h, seguido do **35dNBH** - $t_{1/2} = (2,5 \pm 0,06)$ h e do **35dNBP** - $t_{1/2} = (2,3 \pm 0,03)$ h. Por outro lado, os ésteres com os substituintes cloro e sem qualquer substituinte são os mais suscetíveis à ativação. O composto mais suscetível à ativação foi novamente o **BF** com um $t_{1/2}$ de $0,026 \pm 0,001$ h ou seja $(1,56 \pm 0,06)$ minutos.

Ao contrário do que se observou para a hidrólise no plasma humano, a introdução de cadeias lineares ou aromáticas na porção alcoxílica do éster não tem grande influência na ativação pelo homogenato de micobactérias. Para o mesmo substituinte na porção aciloxílica, não se observa grande variação nos tempos de semi-vida $t_{1/2}$, quando há alteração da cadeia alcoxílica.

Por outro lado, alterações na porção aciloxílica da molécula parecem influenciar as velocidades de ativação dos ésteres em estudo. Também parece existir uma relação entre as velocidades de ativação e a posição na qual os grupos aciloxílicos são inseridos. Além disso, enquanto no plasma humano, os ésteres com o substituinte cloro possuíam hidrólises mais lentas e os ésteres com o substituintes nitro, hidrólise mais rápidas, nestes estudos parece observar-se o efeito contrário. Conforme referido anteriormente, a introdução do grupo cloro, grupo eletroatrator, leva a uma desativação do anel aromático, por efeito indutivo, o que diminui a velocidade de hidrólise. Esta constatação é válida no caso dos benzoatos com os substituintes 2,6-dicloro na porção aciloxílica, os quais exerce um enorme impedimento estereoquímico que dificulta a hidrólise. No entanto, quando o grupo cloro é introduzido na posição 4 do anel aromático observa-se uma grande redução nos tempos de meia vida destes compostos. Por exemplo, para a cadeia propílica, o $t_{1/2}$ do **4ClBP** é 0,14 horas, sendo para o **26dClBP** o tempo de semi-vida de 1,1 horas. Esta ocorrência pode ser devida ao facto do homogenato de micobactérias possuir carboxiesterases⁽⁶⁸⁾, enzimas com grande afinidade para este tipo de substratos. Esta afinidade é maior quando os grupos cloro se encontram na posição 4, enquanto que nas posições 2 e 6, este será mais intenso, uma vez que é exercido por dois grupos cloro, no entanto, nas posições 2 e 6, além do efeito indutivo, existe

também um forte impedimento estereoquímico pelos grupos cloro adjacentes ao carbono carbonílico, o que dificulta a acção dos esterases micobacterianas.

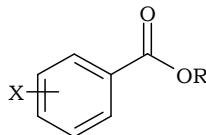
Também a introdução de grupos NO_2 , bem como a posição em que estes se encontram parece ter grande influência na hidrólise. Quando o grupo NO_2 é inserido nas posições 3 e 5, os valores dos tempos de meia vida aumentam ligeiramente em relação aos valores dos tempos de meia, quando este é introduzido na posição 4. Por exemplo, para a cadeia propílica, o $t_{1/2}$ do **4NBP** é 1,5 horas, enquanto o $t_{1/2}$ do **35dNBP** é 2,2 horas. No entanto este aumento não é muito acentuado excepto para o **35dNBF**, que possui um tempo de meia vida de 13 horas, em comparação com o **4NBF**, com o tempo de meia vida de 1,6 horas. Esta diferença pode ser explicada pelo impedimento estereoquímico resultante do grupo fenilo e pelo intenso efeito de ressonância gerado pelos dois grupos NO_2 na posição 3,5, que aumentando a capacidade do grupo para captar os eletrões do anel aromático, dificultará a hidrólise.

3.1.3 - Conclusão

Em suma, estes estudos mostraram que os compostos com o substituinte cloro na posição 4 e com uma cadeia hexílica na porção alcoxílica, nomeadamente o **4CIBH** possuem uma estabilidade considerável no plasma humano e podem ser facilmente ativado pelos esterases das micobactérias. Os compostos com substituinte nitro na posição 3,5 e com cadeias propílicas e hexílicas na porção alcoxílica, nomeadamente o **35dNBP** e o **35dNBH** também parecem alcançar esse objetivo. No entanto, será necessário, comparar os resultados dos estudos de estabilidade com os resultados dos estudos de atividade, pois é necessário que quando o pró-fármaco sofre ativação pelas micobactérias, seja suficientemente ativo contra as micobactérias, de formar a promover a sua destruição.

A Tabela 3.1.5 mostra as razões entre os vários substituintes aciloxílica para a mesma porção alcoxílica na molécula.

Tabela 3.1.5 - Efeito do substituinte na porção aciloxílica dos ésteres derivados do ácido benzóico (com o mesmo grupo alcóxilo) nas constantes de *pseudo*-primeira ordem para as hidrólises em plasma a 80% e em homogenato de micobactérias a 2% em tampão fosfato a pH = 7,4 ($C_i=0,05M$, $I=0,15M$) com 2% de acetonitrilo e à temperatura de 37°C. (Concentração inicial de substrato $C_i=5 \times 10^{-4}M$).



	Plasma 80%			Homogenato micobactérias 2%		
	R					
	-C ₃ H ₇	-C ₆ H ₅	-C ₆ H ₁₃	-C ₃ H ₇	-C ₆ H ₅	-C ₆ H ₁₃
$k_{obs}(X1)/k_{obs}(X2)$	1	12	44	16	63	6
$k_{obs}(H)/k_{obs}(4NO_2)$	36	53	22	24	509	12
$k_{obs}(H)/k_{obs}(35dN)$	3	63	16	2	2	0,84
$k_{obs}(H)/k_{obs}(4Cl)$	12	1,1×10 ⁴	46	12	47	7
$k_{obs}(H)/k_{obs}(26dCl)$	32	0,044	2	1,5	8	2
$k_{obs}(4N)/k_{obs}(35dN)$	4	178	10	7	23	9
$k_{obs}(4Cl)/k_{obs}(26Cl)$	0,31	19	10	10	30	7

A partir da análise desta tabela, observa-se que de uma maneira geral, com os substituintes acilo cloro e nitro aumenta a estabilidade dos ésteres em ambos os meios biológicos estudados. Por exemplo, para a cadeia propílica $k_{\text{obs}}(\text{H})/k_{\text{obs}}(\text{35dNBH}) \approx 36$. Este efeito parece ser mais acentuado, quando são introduzidos substituintes 3,5-dinitro. Também se observa que em todos os casos, a maior variação é observada com o grupo alcóxilo fenílico. Apesar do impedimento estereoquímico introduzido pelo grupo fenol, este possui um valor de pK_a ($pK_a=9,90$), o que facilita a saída do grupo abandonante, favorecendo a hidrólise.⁽¹⁰²⁾

Comparando os substituintes nitro NO_2 nas posições 3,5 e na posição 4 observa-se que a posição 3,5 desfavorece a hidrólise sendo assim mais lenta. Esta diferença pode ser explicada pelo facto do efeito eletroatrator na posição 3,5 ser influenciado pelo efeito indutivo, enquanto na posição 4 há mais influência pelo efeito de ressonância. Na estabilização por ressonância na posição 4, a configuração mais favorável é aquela em que a carga positiva se encontra no carbono ligado ao carbonilo, assim um substituinte electroatrator como o grupo nitro desativa o anel em todas configurações de ressonância, o que dificulta o acesso ao grupo carbonilo, e consequentemente a hidrólise. Na posição 3,5 a carga positiva nunca é colocada no carbono do grupo carbonílico, o que leva a que a desativação do anel não seja tão intensa, quanto a que ocorre na posição 4, favorecendo deste modo a hidrólise - Figura 3.30. Conforme já referido anteriormente, também se observa que o substituinte cloro na posição 2,6 dificulta a hidrólise, devido ao impedimento estereoquímico gerado pelos grupos cloro.

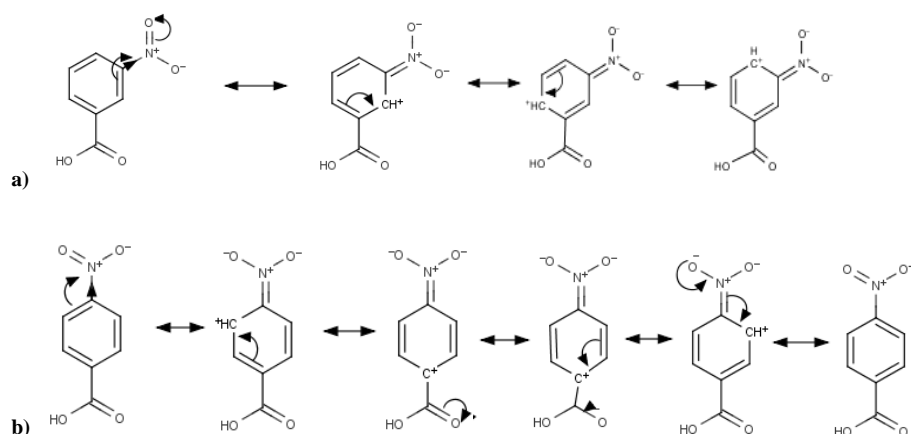


Figura 3.1.30- Representação do efeito de ressonância nos grupos nitro nas posições 3,5 (a) e na posição 4 (b) da porção aciloxílica no anel aromático.

Também, para a mesma posição observam-se diferenças na estabilidade, quando são introduzidos grupos diferentes. Quando se introduz um grupo nitro NO_2 na posição 4, a hidrólise será mais lenta, do que quando se introduz um grupo cloro na mesma posição. Este efeito pode ser devido, ao facto do grupo nitro ser um grupo eletroatrator, retirando os eletrões por ressonância levando à desativação do anel, dificultando a hidrólise. No caso do grupo cloro, este também é um desativador, porém fraco, atraindo os eletrões do anel aromático por efeito indutivo não sendo no entanto este efeito tão pronunciado como o efeito de ressonância.

Além da introdução de diferentes substituintes na porção aciloxílica, também a introdução de cadeias aromáticas na porção alcoxílica, aumenta ou diminui as razões em relação aos valores obtidos, quando são introduzidas cadeias lineares. Conforme já referido, o fenol é um bom abandonante, mas o facto de estarem no anel grupos desativantes pode favorecer mais ou menos a libertação deste grupo.

Pelos resultados obtidos conclui-se que parece haver uma relação da estabilidade dos compostos com os grupos substituintes no anel aromático da porção aciloxílica bem como com as cadeias alcoxílicas. Deste modo, parece que fatores, como o $\text{p}K_a$ e a lipofilia dos compostos podem influenciar a estabilidade destes nos meios biológicos. No sentido de avaliar quais os fatores que terão maior impacto na estabilidade dos compostos, bem como avaliar os efeitos de diversos descritores nessa mesma estabilidade, realizaram-se estudos de relação estrutura - atividade (REA). Estes estudos serão abordados no capítulo 4.

3.2 – Estudos de atividade dos derivados do ácido benzóico

3.2 - Estudo da atividade antimicobacteriana dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico

A determinação das CMI's foi efetuada de acordo com o Procedimento Experimental descrito anteriormente - Capítulo 2. A partir da observação direta das placas de 96 poços onde se avaliou o crescimento das micobactérias com os compostos em estudo pode-se determinar as CMI's, através da turvação dos poços, o que indica a ocorrência de crescimento bacteriano.⁽¹⁰³⁾ Esta avaliação da turvação dos poços foi feita pela leitura da densidade ótica (DO) usando um leitor de placas ao comprimento de onda de 600 nm, o que permitiu determinar estas CMI's com uma maior exatidão. A determinação das CMI's foi realizada em três estirpes de micobactérias: *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium tuberculosis*.

Após terem sido feitas as leituras das DOs para cada um dos poços, os valores de DO foram convertidas em unidade formadoras de colónias (UFC/mL). Assim considerando que a 600 nm uma DO de 0,1 corresponde a 10^7 células/mL⁽⁸²⁾ e sendo a DO inicial para o *Mycobacterium smegmatis* de 0,05 e para as estirpes de *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium tuberculosis* Ra de 0,01 existirão então 5×10^5 e 10^5 células/poço respetivamente. As DOs serão convertidas em número de células multiplicando o valor correspondente a cada poço pelo número de células respetivo e dividindo pela DO inicial.

Determinou - se então a percentagem de células, dividindo o número de células avaliada para cada poço pelo número de células máximo observado que corresponde ao número de células total. Foi necessário fazer esta conversão para se poderem comparar as CMI's das diferentes estirpes, uma vez que se partiu de valores diferentes para as DO iniciais.

3.2.1 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em *M. smegmatis*

O *Mycobacterium smegmatis* é um modelo bacteriano bastante apropriado para a determinação de CMIs, uma vez que esta bactéria apresenta um crescimento rápido e não é patogénica. Esta micobactéria apresenta uma resistência natural à pirazinamida e um mecanismo de efluxo bastante ativo. Assim, pretende-se avaliar se esta micobactéria apresentará ou não susceptibilidade aos ésteres do ácido benzóico e comparar a atividade destes compostos com os valores de tempos de semi-vida obtidos nos estudos de estabilidade em homogenato de *M. smegmatis*. A atividade dos pró-fármacos em *M. smegmatis* foi estudada através da determinação das concentrações mínimas inibitórias CMIs

As Figuras 3.2.1 e 3.2.2 apresentam os valores de percentagem de células obtidos para a estirpe *M. smegmatis*. Todos os ensaios foram feitos em triplicado, nas concentrações selecionadas (25µg/mL - 400µg/mL) e nos dois valores de pH estudados - pH = 6,5 e pH = 5,9:

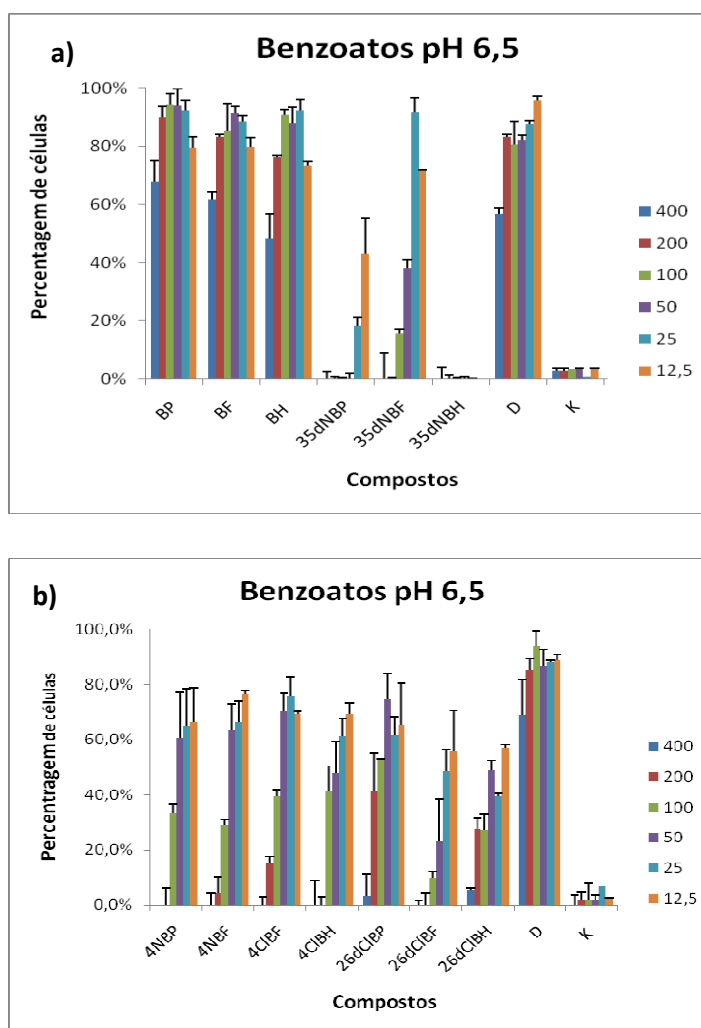


Figura 3.2.1 - Atividade antimicrobiana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em *M. smegmatis* a pH 6,5.

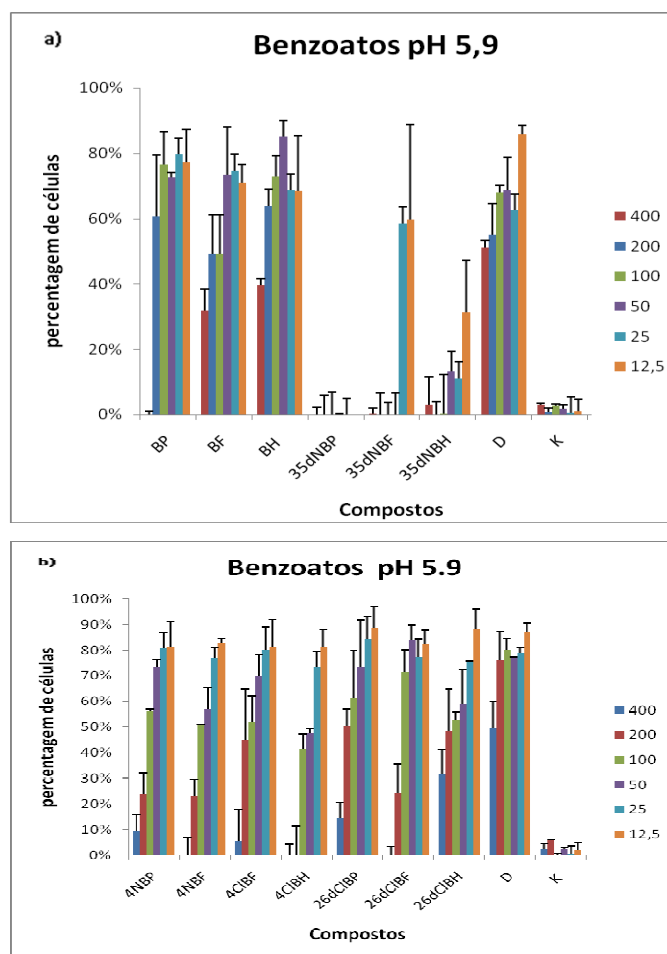
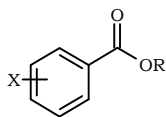


Figura 3.2.2- Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em *M. smegmatis* a pH 5,9.

Pela análise dos gráficos, as atividades podem ser determinadas com base na altura das barras e por comparação direta com os controles - positivo e negativo⁽¹⁰³⁾ tendo-se obtido os resultados apresentados na Tabela 3.2.1

A partir da observação dos resultados das Figuras 3.2.1 e 3.2.2 e ainda da Tabela 3.2.1, pode-se concluir que os compostos mais eficazes contra esta estirpe são **35dNBP** nos dois valores de pH e **35dNBH** para o valor de pH de 5,9. Por outro lado, os compostos menos ativos são **26dCIBP**, **26dCIBH**, **BP**, **BF** e **BH**. Além disso, tal como seria de esperar a atividade antimicobacteriana é maior a pH mais ácido uma vez que nestas condições haverá uma maior percentagem de espécies neutras e ocorrendo mais facilmente uma difusão dessas espécies neutras através das membranas das micobactérias levando à acumulação dos compostos no interior das células com a consequente perturbação do potencial de membrana.^(41,49,52)

Tabela 3.2.1 - Valores de CMI e respectiva percentagem de células para o *Mycobacterium smegmatis* pH 6,5 e 5,9.



Composto	X	R	CMI <i>M. smegmatis</i>					
			pH 6,5		Percentagem de células (%)	pH 5,9		Percentagem de células (%)
			µg/mL	mM		µg/mL	mM	
BP	H	-C ₃ H ₇	>400	2,44	67,9±7,2	400	2,44	3,0±1,0
BF	H	-C ₆ H ₅	>400	2,02	61,7±2,5	400	2,02	31,9±6,5
BH	H	-C ₆ H ₁₃	>400	1,85	48,4±8,4	>400	1,85	48,4±8,4
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	50	0,20	0,0	<12,5	0,05	0,0
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	100	0,35	15,7±1,4	50	0,17	12,2±3,8
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	12,5	0,04	0,0	12,5	0,04	31,3±15,9
4ClBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	-	-	-	-	-	-
4ClBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	400	1,72	0,0	400	1,72	15,1±2,6
4ClBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	200	0,42	1,9±0,5	200	0,42	3,1±3,6
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	200	0,96	0,0	200	0,96	23,7±8,3
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	200	0,77	4,2±0,2	200	0,77	23,0±6,8
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-	-	-	-	-	-
26dClBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	400	1,72	13,2±8,0	400	1,72	14,2±6,6
26dClBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	100	0,38	9,8±2,2	200	0,75	24,0±11,6
26dClBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	400	1,45	5,3±0,5	400	1,45	31,4±9,6

3.2.2 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em *M. bovis* BCG:

As estirpes de *Mycobacterium bovis* BCG apresentam uma resistência natural à pirazinamida e uma elevada atividade de pirazinamidase micobacteriana. No entanto, ao contrário de *M. smegmatis*, a sua resistência é independente de mutações. Sendo um modelo usado para a tuberculose, avaliou-se a atividade dos pró-fármacos estudados em *Mycobacterium bovis*.^(49,52)

As Figuras 3.2.3 e 3.2.4, bem como a Tabela 3.2.2 apresentam os valores de percentagem de células obtidos para a espécie *M. bovis* BCG. Todos os ensaios foram feitos em triplicado, nas concentrações selecionadas (25µg/mL - 400µg/mL) e nos dois valores de pH estudados - pH = 6,5 e pH = 5,9:

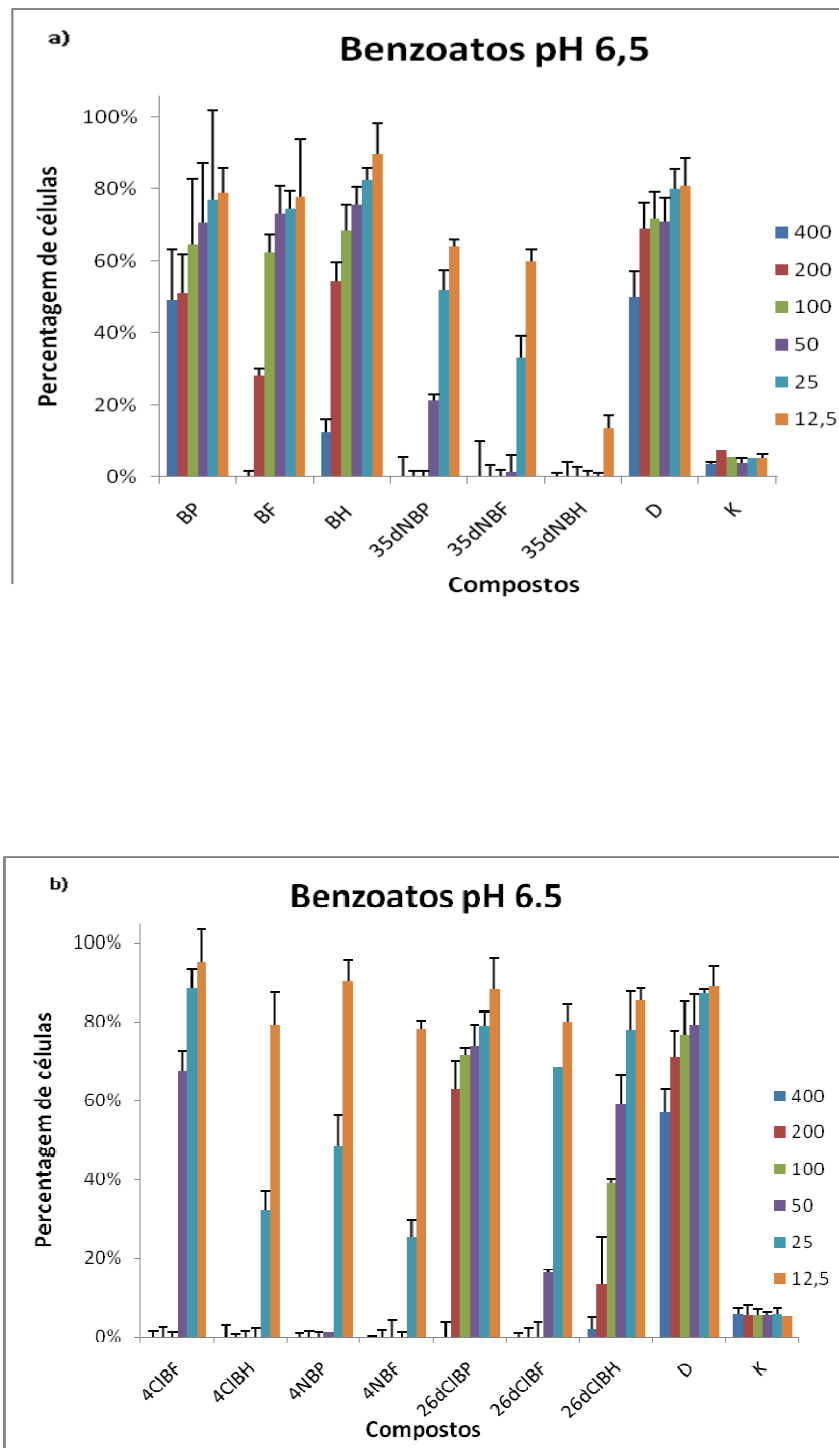


Figura 3.2.3- Atividade antimicrobiana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em *Mycobacterium bovis* BCG a pH 6,5.

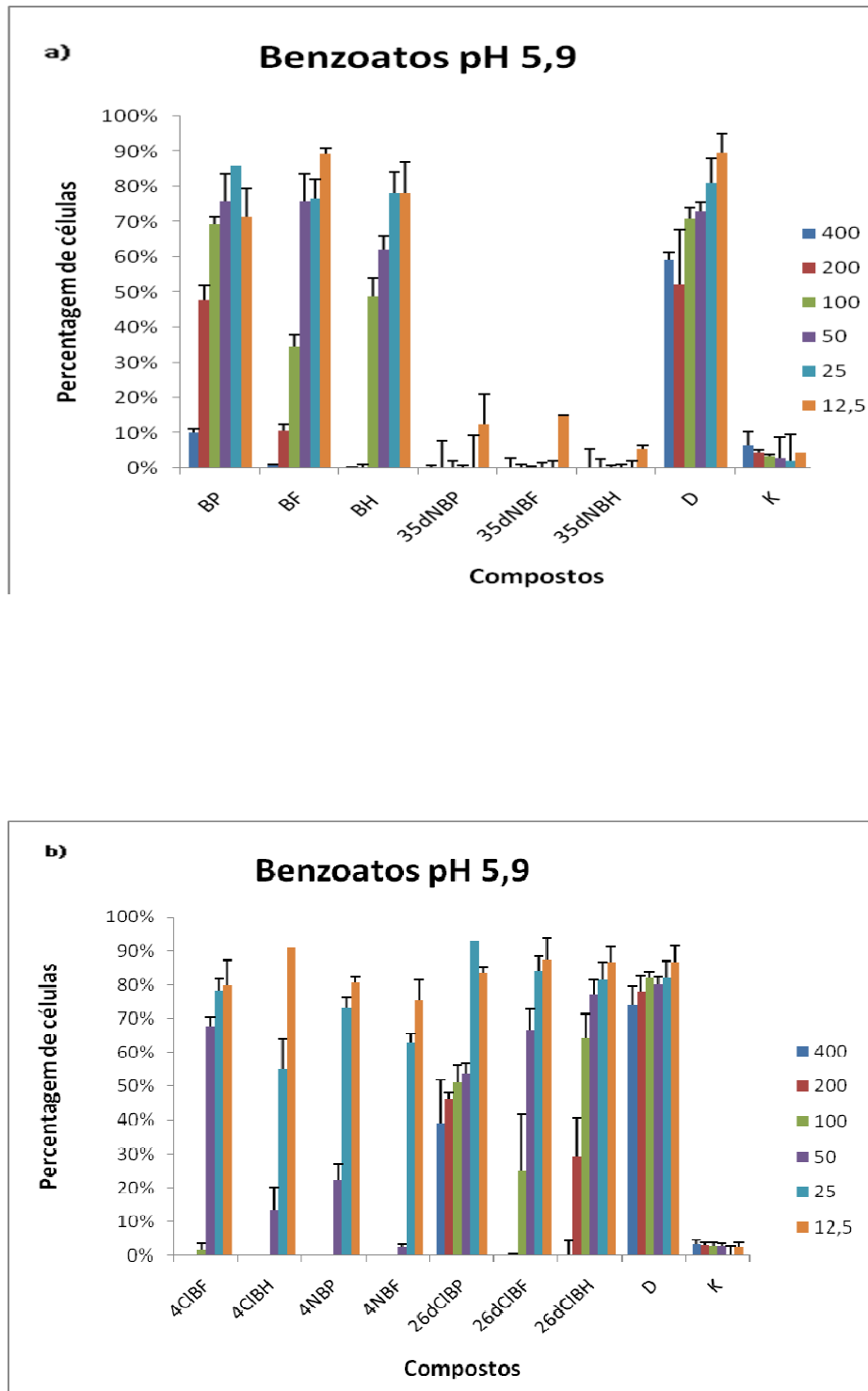
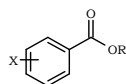


Figura 3.2.4- Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH (a) e dos benzoatos 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH (b) em *Mycobacterium bovis* BCG a pH 5,9

Tabela 3.2.2 - Valores de CMI e respectiva percentagem de células para o *Mycobacterium bovis* a pH 6,5 e 5,9.



Composto	X	R	CMI <i>M bovis</i>					
			pH 6,5		Percentagem de células (%)	pH 5,9		Percentagem de células (%)
			µg/mL	mM		µg/mL	mM	
BP	H	-C ₃ H ₇	>400	2,44	14,1±1,0	400	2,44	0,0
BF	H	-C ₆ H ₅	400	2,02	0,0	200	1,42	10,7±1,6
BH	H	-C ₆ H ₁₃	>400	1,85	0,4±0,0	200	0,93	0,0
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	50	0,20	11,9±1,6	25	0,10	9,7± 6,3
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	50	0,17	12,4±1,4	25	0,09	3,9±1,9
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	25	0,084	0,4±0,0	<12,5	0,04	5,5±1,0
4CIBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	-	-	-	-	-	-
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	100	0,43	8,5±4,6	100	0,43	17,8±2,1
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	50	0,21	3,0±0,1	50	0,21	13,5±6,7
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	100	0,48	1,1±0,2	50	0,24	22,4±4,5
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	50	0,19	6,5±1,1	50	0,19	2,45±0,80
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-	-	-	-	-	-
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	400	1,72	9,7±3,8	400	1,72	39,3±12,6
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	100	0,37	3,9±0,2	100	0,37	25,1±16,7
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	400	1,45	5,4±3,2	400	1,45	1,9±0,9

A pH 6,5, o composto que apresentou maior atividade foi o **35dNBH**. Também os compostos **4CIBF**, **4CIBH**, **4NBP**, **4NBF** e **35dNBF** apresentaram uma atividade bastante considerável, sendo importante referir que todos os compostos apresentaram de um modo geral maior atividade a pH 5,9 tal como seria de esperar. A pH 5,9 verificou-

se que o composto mais ativo foi o 35dNBP. À semelhança do que se observou no *M. smegmatis*, os compostos menos ativos foram **26dCIBP**, **26dCIBH**, **BP**, **BF** e **BH**.

3.2.3 - Atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em *M. tuberculosis* Ra¹.

O *M. tuberculosis* é a única micobactéria susceptível ao ácido pirazinóico, a forma ativa da pirazinamida.⁽⁴⁸⁾ Esta sensibilidade pode ser explicada pelo mecanismo de efluxo deficiente desta estirpe e pela dificuldade em manter o gradiente energético. Avaliou-se o efeito sobre esta estirpe de micobactérias dos pró-fármacos em estudo ao pH de 6,5. Todos os ensaios foram feitos em triplicado, nas concentrações selecionadas (25µg/mL - 400µg/mL). A Figura 3.2.5 apresenta os valores de CMI obtidos para a estirpe *M. tuberculosis* Ra.

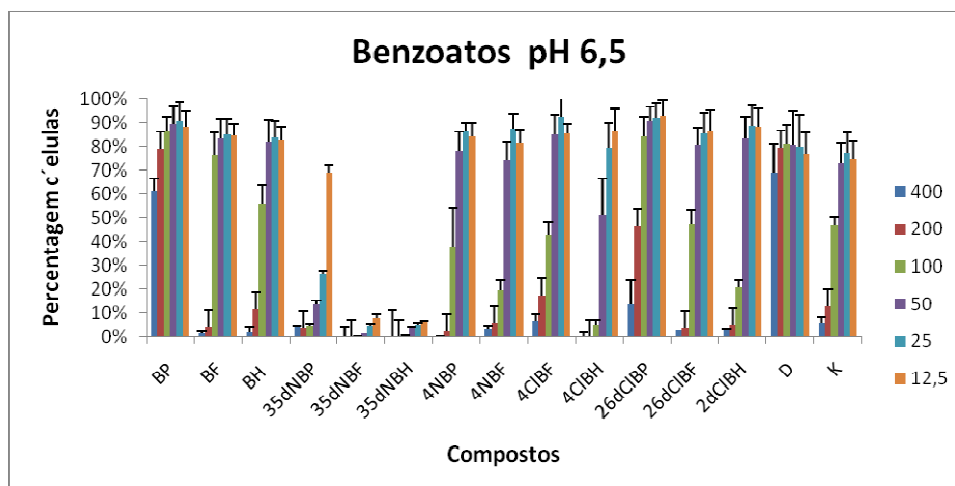
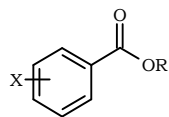


Figura 3.2.5 - Atividade antimicobacteriana dos benzoatos BP, BF, BH, 35dNBP, 35dNBF e 35dNBH, 4NBP, 4NBF, 4CIBF, 4CIBH, 26dCIBP, 26dCIBF e 26dCIBH em *M. tuberculosis* a pH 6,5

A partir de uma primeira análise dos resultados, observa-se que os compostos mais ativos foram o **35dNBF** e o **35dNBH**. O **4CIBH** também apresentou uma atividade bastante considerável. Por outro lado, os compostos menos ativos foram o **26dCIBP** e **BP**. Apesar disso, pode-se observar que os valores dos CMIs para estas estirpes são mais baixos do que os valores de CMIs para as outras estirpes, provavelmente devido ao deficiente mecanismo de efluxo existente nesta estirpe bacteriana. Assim, os compostos serão difundidos para dentro das células e conseguirão ser convertidos nas suas formas ativas.

¹ Os estudos de atividade dos pró-fármacos derivados do ácido benzóico em *M. tuberculosis* foram executados pelo Mestre Nuno Carmo (CPM-URIA)

Tabela 3.2.3 -Valores de CMI e respectiva percentagem de células para o *Mycobacterium tuberculosis* pH 6,5.



Composto	X	R	CMI <i>M. tuberculosis</i> Ra pH 6,5		
			µg/mL	mM	Percentagem de células
BP	H	-C ₃ H ₇	>400	2,44	61,1±6,8
BF	H	-C ₆ H ₅	200	1,01	4,2±0,6
BH	H	-C ₆ H ₁₃	200	0,93	2,1±0,5
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	100	0,20	4,8±0,5
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	<12,5	0,04	7,7±1,7
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	<12,5	0,04	6,2±0,5
4CIBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	-	-	-
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	400	1,72	6,8±0,9
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	100	0,42	5,2±2,1
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	200	0,96	2,4±0,3
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	200	0,77	5,8±1,1
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-	-	-
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	>400	1,72	13,8±5,2
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	200	0,75	3,7±0,3
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	200	0,73	4,8±0,6

3.2.4 Conclusão

De uma maneira geral, observa-se que nas três estirpes de micobactérias, os compostos com grupos 3,5-dinitro na porção aciloxílica são aqueles que possuem maior atividade. Também se observa nas três estirpes que os compostos com menor atividade são os que possuem o substituinte 2,6-dicloro na porção aciloxílica e ainda os que não têm qualquer substituinte no anel aromático da porção aciloxilo.

Pelos resultados anteriores verifica-se que os benzoatos com cadeias fenílicas ou hexílicas na porção alcóxilo apresentam valores de CMI mais baixas relativamente aos compostos com cadeias propílicas. Nalguns compostos, o facto de a cadeia ser linear ou aromática também parece influenciar a atividade, como é o caso dos compostos com o grupo 2,6-dicloro na porção aciloxílica. Nesta série de compostos, o 26dCLBF apresenta em geral uma atividade mais baixa em relação ao 26dCIBP e ao 26dCIBH (exceto no *M. tuberculosis*).

Em suma, através dos resultados obtidos, parece haver uma relação da atividade dos compostos com os grupos substituintes no anel aromático da porção aciloxílica bem como com as cadeias alcoxílicas. Também as CMIs determinadas em *M. tuberculosis* Ra apresentam valores mais baixos que nas outras duas estirpes estudadas. Sendo *M. tuberculosis* Ra o modelo que mais se aproxima da infeção, poder-se-á selecionar com base nos resultados obtidos os compostos mais promissores para a tuberculose.

No sentido de avaliar quais os fatores que poderão influenciar a atividade antimicobacteriana dos compostos em estudo realizaram-se estudos de relação estrutura - atividade (REA). Para isso tentou-se avaliar qual o efeito de diversos descritores, tais como lipofilia, pKa ou o efeito dos substituintes, para a atividade desses compostos nas diferentes estirpes de micobactérias. Estes estudos serão abordados no próximo capítulo.

**4. EFEITO DA ESTRUTURA DOS
COMPOSTOS NA
CORRESPONDENTE ESTABILIDADE
E ATIVIDADE.**

4. - Estudos do efeito da estrutura dos compostos na correspondente estabilidade e atividade.

Tentou-se avaliar qual o efeito da estrutura dos ésteres descritos nos capítulos anteriores na estabilidade, tanto em plasma como no homogenato das micobactérias, e ainda na atividade antimicobacteriana dos referidos compostos.

Para isso foram usados diferentes descritores existentes na literatura. Estes descritores são agrupados conforme descrevem propriedades hidrofóbicas, eletrónicas ou de polaridade e estereoquímicas.

O carácter lipofílico de um fármaco pode ser medido experimentalmente, através da sua distribuição relativa numa mistura de água (fase aquosa) com n-octanol (fase orgânica). O parâmetro que determina esta distribuição relativa designa-se coeficiente de partição (P), e normalmente é expresso por $\log P$. Normalmente é possível determinar este parâmetro a partir do quociente entre a concentração do fármaco no octanol pela concentração do fármaco na água.⁽⁴³⁾

Os efeitos eletrónicos manifestam-se na polaridade e na ionização do fármaco⁽⁴³⁾. Assim, a maioria dos efeitos eletrónicos no éster provêm do substituinte na porção alcóxilo (R) e do substituinte (X) na porção acilóxilo, que exercerão efeito no caráter eletrónico do anel aromático e do grupo carbonilo.⁽¹⁰⁴⁾ Para contabilizar estes efeitos eletrónicos existem dois descritores: a constante de Hammett, σ_H (cadeia acilóxilica) e o parâmetro de Taft, σ^* (da cadeia alcoxílica). A constante de Hammett (σ_H) mede quantitativamente a capacidade de um substituinte num anel aromático de dar ou aceitar eletrões.⁽¹⁰⁴⁾ O parâmetro de Taft (σ^*) mede quantitativamente a polaridade da porção alcoxílica do éster e depende apenas da deslocalização dos electrões naquela porção da molécula.⁽¹⁰⁵⁾ Além destes parâmetros foram ainda estudados outros parâmetros relacionados com o efeito da polaridade, como o pK_a do ácido (pK_{aac}) e o pK_a do grupo abandonante (pK_{aga}). Este último permite avaliar a capacidade das cadeias alcoxílicas serem removidas da molécula durante a hidrólise.⁽¹⁰²⁾ Por outro lado o pK_a do ácido é indicativo da facilidade de dissociação do composto e proporção das espécies em equilíbrio nas condições utilizadas.^(102, 106)

As propriedades estereoquímicas estão relacionadas diretamente com a interação entre o fármaco com o local de ligação do seu alvo. Um substituinte mais volumoso, tanto pode exercer um impedimento estereoquímico e dificultar a ligação do fármaco ao seu local alvo, como pode orientar a estrutura corretamente de modo a favorecer essa ligação.⁽⁴³⁾ Para quantificar estes efeitos são utilizados geralmente dois descritores: parâmetro estereoquímico de Taft (E_s) e o parâmetro de Charton (E_{sv}). O parâmetro estereoquímico de Taft (E_s) contabiliza o efeito estereoquímico do substituinte.⁽⁴⁾ Este parâmetro pode ser obtido a partir da comparação das velocidades de hidrólise de ésteres alifáticos substituídos com o éster padrão, em condições acídicas.

$$E_s = \log \frac{k_x}{k_0} = \log k_x - \log k_0 \quad \text{exp. 4.1}$$

em que:

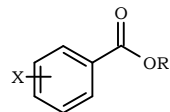
k_x -velocidade de hidrólise do éster alifático com o substituinte X

k_0 -velocidade de hidrólise do éster padrão

Este parâmetro toma valores positivos para substituintes menores, como o H, F e valores negativos para substituintes mais volumosos, como o $-C(CH_3)_3$ e $-C_2H_5$. Uma das limitações deste parâmetro é que apenas contabiliza o efeito estereoquímico nas interações intramoleculares não tendo em conta interações intermoleculares entre o fármaco e os locais de ligação do alvo.⁽⁴³⁾ Assim, foi proposta uma nova abordagem por Charton, que sugeriu um parâmetro que deriva do parâmetro de Taft (E_s), mas é baseado em cálculos estatísticos que consideram o raio de van der Waals do grupo correspondente, o qual é influenciado tanto pelos efeitos indutivos e de ressonância. Este parâmetro é denominado parâmetro de Charton (E_{sv}).^(104, 107)

Na Tabela 4.1 podem observar-se os valores obtidos para os diversos descritores com base nas equações obtidas na literatura ou através programas.^(106, 108, 109)

Tabela 4.1- Valores dos diferentes descritores para os ésteres derivados do ácido benzóico.

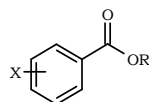


Composto	X	R	log P	pK_{aac}	pK_{aga}	σ_H	σ^* Taft R	Esv Charton	Es _(corr) Taft R
BP	H	-C ₃ H ₇	2,92	4,21	15,76	0	-0,12	0, 68	-0,36
BF	H	-C ₆ H ₅	3,38	4,21	9,9	0	0,6	0,57	0,23
BH	H	-C ₆ H ₁₃	4,51	4,21	15,76	0	-0,25	0,73	-0,30
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	2,40	2,50	15,76	1,48	-0,12	0, 68	-0,36
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	2,74	2,50	9,9	1,48	0,75	0,57	0,23
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	3,57	2,50	15,76	1,48	-0,25	0,73	-0,30
4CIBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	3,52	3,98	15,76	0,24	-0,12	0, 68	-0,36
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	4,1	3,98	9,9	0,24	0,75	0,57	0,23
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	4,97	3,98	15,76	0,24	-0,25	0,73	-0,30
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	2,58	3,41	15,76	0,78	-0,12	0, 68	-0,36
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	3,16	3,41	9,9	0,78	0,75	0,57	0,23
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	3,73	3,41	15,76	0,78	-0,25	0,73	-0,30
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	3,98	1,69	15,76	2,56	-0,12	0, 68	-0,36
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	4,51	1,69	9,9	2,56	0,75	0,57	0,23
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	5,37	1,69	15,76	2,56	-0,25	0,73	-0,30

4.1. - Efeito da estrutura dos derivados do ácido benzóico na estabilidade nos ensaios em meio biológico.

De um modo geral, o comprimento das cadeias na porção alcofílica, bem como o substituinte existente na porção acilofílica parecem influenciar as hidrólises dos ésteres. De facto, parece que ésteres com cadeia maiores, e portanto mais lipofílicos terão hidrólises mais lentas. ⁽⁸²⁾ Por outro lado, o efeito do pK_a parece influenciar a hidrólise dos compostos, uma vez que grupos com pK_a menores terão mais facilidade de serem hidrolisados. Para avaliar quais os efeitos que influenciam a estabilidade dos ésteres estudados, estabeleceram-se relações entre os $\log k_{obs}$ e os diferentes descritores moleculares. Os valores de $\log k_{obs}$ foram calculados a partir dos valores de k_{obs} expressos nas Tabelas 3.1.2 e 3.1.3 para os vários compostos nos meios biológicos utilizados: plasma humano e homogenato de micobactérias. Estes valores encontram-se na Tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Valores de $\log k_{\text{obs}}$ calculados para os ésteres dos derivados do ácido benzóico nos meios biológicos: plasma humano e homogenato de *M. smegmatis*.



Composto	X	R	$\log k_{\text{obs}}$	
			Plasma 80%	Homogenato <i>M. smegmatis</i> 2%
BP	H	-C ₃ H ₇	0,31	0,89
BF	H	-C ₆ H ₅	1,89	1,43
BH	H	-C ₆ H ₁₃	0,04	0,53
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	-1,24	-0,49
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,17	-1,28
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-1,30	-0,55
4ClBP	4-Cl	-C ₃ H ₇	-0,19	0,69
4ClBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	0,10	1,11
4ClBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	-1,17	0,61
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,32	-0,32
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	-1,18	-0,37
4NBH	4-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-1,60	-0,23
26dClBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	-1,77	-0,21
26dClBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	-2,15	-0,24
26dClBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	-1,72	-0,34

4.1.1 - Estudos de estabilidade em plasma

A relação da lipofilia com a estabilidade em plasma foi determinada com base nos valores de $\log k_{\text{obs}}$ expressos na Tabela 4.2 e os valores de $\log P$ expressos na Tabela 4.1 e encontra-se na Figura 4.1. A Figura 4.1 permite observar que não se verifica qualquer correlação entre a constante de *pseudo*-primeira ordem, avaliada como $\log (k_{\text{obs}})$ e $\log P$ para todos os compostos estudados. No entanto, observa-se um aumento do k_{obs} , quando é introduzida uma cadeia aromática na porção alcóxílica, excepto para o composto **26dClBF**.

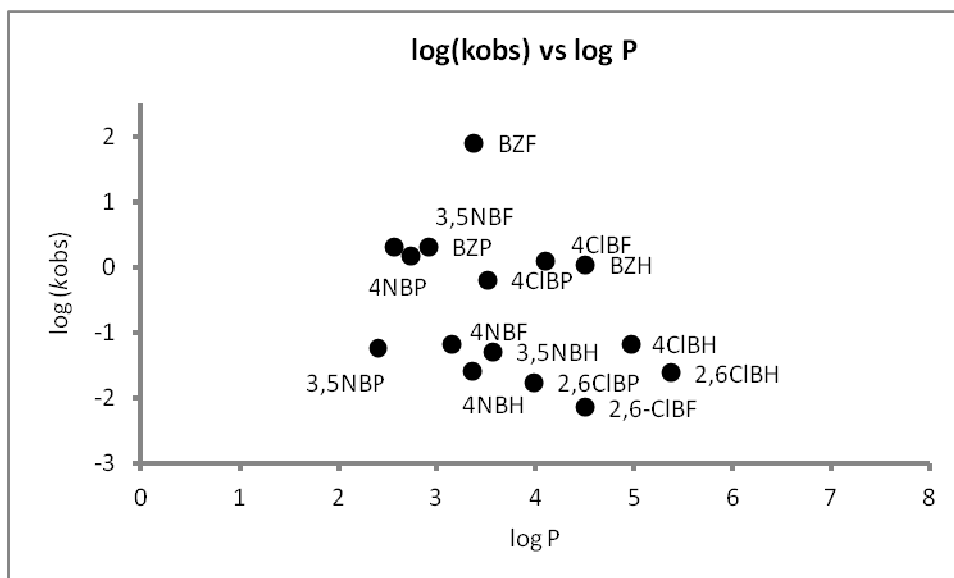


Figura 4.1- Relação entre o valor de $\log k_{\text{obs}}$ em plasma humano e a lipofilia, $\log P$.

Foi também analisado o efeito do pK_{aac} da porção aciloxílica na hidrólise em plasma dos compostos estudados com base nos valores de $\log k_{\text{obs}}$ da Tabela 4.2 e os valores de pK_{aac} da Tabela 4.1 - Figura 4.2

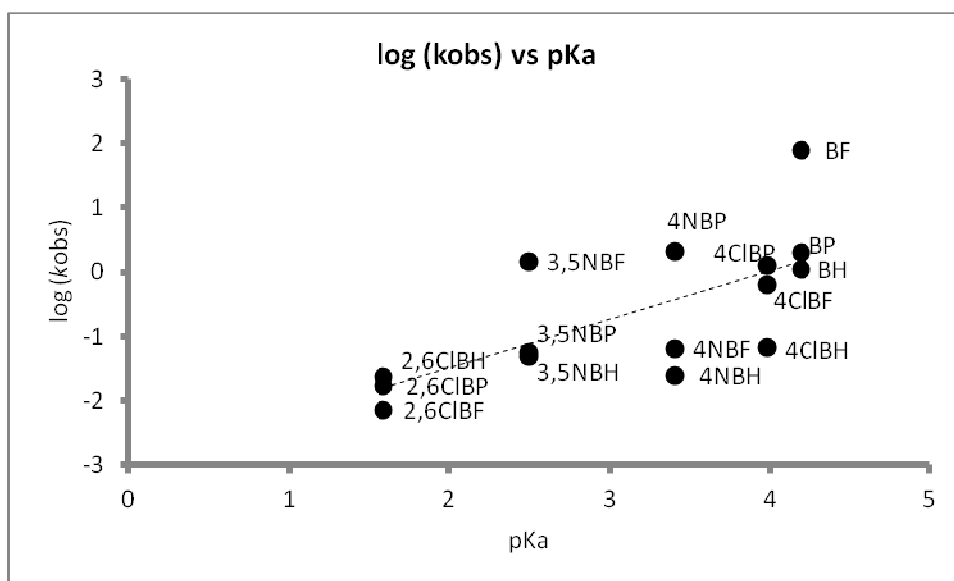


Figura 4.2- Relação entre o valor de $\log k_{\text{obs}}$ em plasma humano e o pK_a .

A Figura 4.2 permite observar uma correlação moderada entre a constante de *pseudo*-primeira ordem, avaliada como $\log(k_{\text{obs}})$ e o $\text{p}K_{\text{a}}$ para todos os compostos estudados - expressão 4.2

$$\log(k_{\text{obs}}) = 0,79(\pm 0,21) \text{p}K_{\text{a}} - 3,1(\pm 0,68) \quad \text{exp. 4.2}$$

(n=15) ($R^2=0,532$) (s=0,77)

Observa-se que, à exceção do **26dCIBH**, se verifica um aumento da estabilidade à medida que a cadeia linear alcofílica aumenta. Por outro lado, observa-se que os compostos que possuem as hidrólises mais lentas são os que possuem o substituinte 2,6 dicloro, enquanto as hidrólises mais rápidas se observam nos ésteres sem substituintes na porção aciloxílica. Deste modo tentou-se ver o efeito conjunto do $\text{p}K_{\text{aac}}$ com a lipofilia, $\log P$, e ainda a constante de polaridade de Taft σ^* para a cadeia alcofílica dos ésteres na hidrólise em plasma sendo obtida a correlação da expressão 4.3

$$\log(k_{\text{obs}}) = -2,6(\pm 2,1) \text{p}K_{\text{aac}} + 0,59(\pm 0,36) \text{p}K_{\text{aac}}^2 - 3,0(\pm 2,1) \log P + 0,33(\pm 0,27) \log P^2 + 0,74(\pm 0,52) \sigma^* + 7,6(\pm 5,3) \quad \text{exp. 4.3}$$

(n=15) ($R^2=0,733$) (s=0,70)

A expressão 4.3 permite concluir que a hidrólise em plasma apresenta uma dependência quadrática com $\text{p}K_{\text{aac}}$ e com $\log P$, sendo linear com o parâmetro de Taft, σ^* .

Visto que a porção aciloxílica dos ésteres estudados parecer influenciar a estabilidade dos compostos, analisou-se ainda o efeito do parâmetro de Hammett, σ_{H} na hidrólise em plasma e sendo adicionado este parâmetro aos descritores da expressão anterior verificou-se uma melhoria no correspondente coeficiente de correlação - expressão 4.4.

$$\log(k_{\text{obs}}) = -7,9(\pm 4,5) \text{p}K_{\text{aac}} + 0,75(\pm 0,39) \text{p}K_{\text{aac}}^2 - 0,35(\pm 0,30) \log P - 0,61(\pm 0,49) \sigma^* - 4,5(\pm 3,3) \sigma_{\text{H}} + 22(\pm 14) \quad \text{exp 4.4}$$

(n=15) ($R^2=0,742$) (s=0,69)

A expressão 4.4 permite concluir que a hidrólise dos compostos estudados em plasma não depende de um único fator mas apresenta uma dependência multiparamétrica sendo quadrática com o $\text{p}K_{\text{aac}}$ e linear com os restantes descritores $\log P$, σ^* e σ_{H} .

4.1.2 - Estudos de estabilidade em homogenato de micobactérias *M. smegmatis*

A relação da lipofilia com a estabilidade em plasma foi determinada com base nos valores de $\log(k_{\text{obs}})$ expressos na Tabela 4.2 e os valores de $\log P$ expressos na Tabela 4.1. A relação entre a estabilidade em plasma, avaliada por $\log(k_{\text{obs}})$, e a lipofilia dos compostos encontra-se na Figura 4.3:

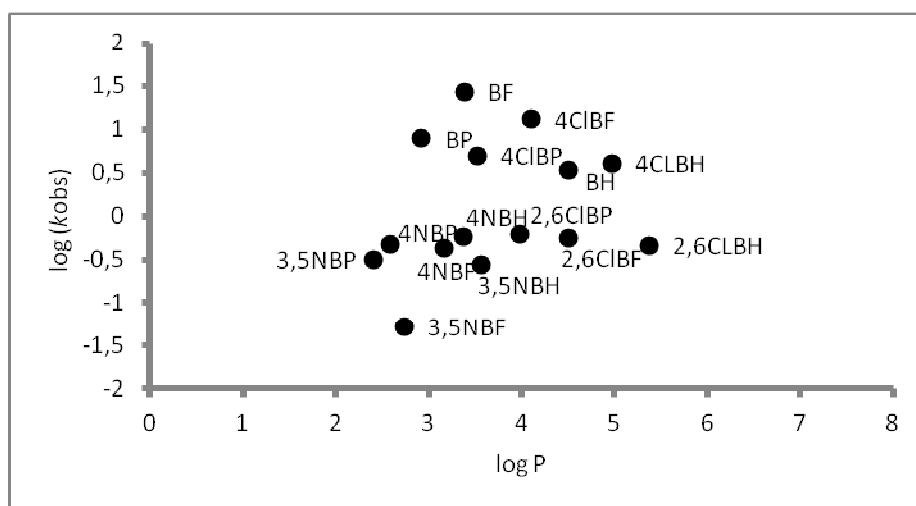


Figura 4.3- Relação entre o valor de $\log k_{\text{obs}}$ em homogenato de *M. smegmatis* e a lipofilia, $\log P$.

A Figura 4.3 permite observar que não se verifica qualquer correlação entre a constante de *pseudo*-primeira ordem, avaliada como $\log(k_{\text{obs}})$, e $\log P$ para todos os compostos estudados. Foi também analisado o efeito do pK_{aac} da porção aciloxílica na hidrólise no homogenato de micobactérias dos compostos estudados com base nos valores de $\log k_{\text{obs}}$ da Tabela 4.2 e nos valores de pK_{aac} da Tabela 4.1 - Figura 4.4

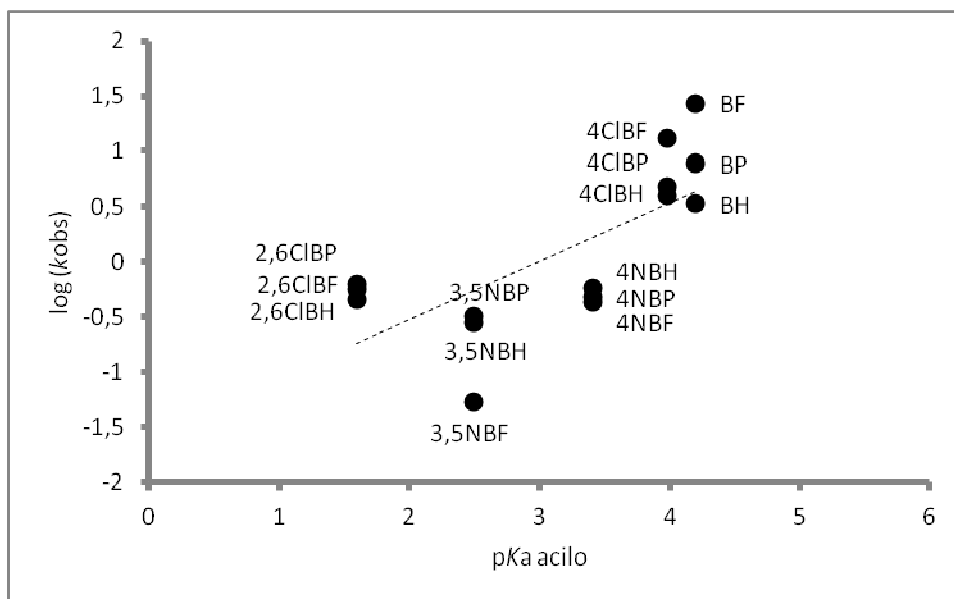


Figura 4.4- Relação entre o valor de $\log k_{\text{obs}}$ no homogenato de micobactérias e o $\text{p}K_{\text{aac}}$

A Figura 4.4 permite observar uma correlação moderada entre a constante de *pseudo*-primeira ordem, avaliada como $\log(k_{\text{obs}})$ e o $\text{p}K_{\text{aac}}$ para todos os compostos estudados - expressão 4.5.

$$\log(k_{\text{obs}}) = 0,53(\pm 0,14) \text{p}K_{\text{aac}} - 1,6(\pm 0,47) \quad \text{exp. 4.5}$$

(n=15) ($R^2=0,512$) (s=0,54)

Apenas se observa que os compostos não substituídos na porção aciloxílica ou com o substituinte 4-cloro são os que têm hidrólises mais rápidas, enquanto os compostos 2,6-dicloro, nas posições *orto* ou 3,5-dinitro, nas posições *meta* são os que apresentam hidrólises mais lentas.

Os resultados anteriores parecem indicar que a porção aciloxílica dos ésteres estudados parece influenciar hidrólise no homogenato das micobactérias daqueles compostos, tendo-se verificado uma melhoria no coeficiente de correlação de $\log k_{\text{obs}}$ quando se considerou também o parâmetro de Hammett, σ_{H} , para a porção aciloxílica do éster e ainda o correspondente valor de $\log P$, de acordo com a Tabela 4.1 - expressão 4.6.

$$\log(k_{\text{obs}}) = 3,0(\pm 1,9) \text{p}K_{\text{aac}} + 0,20(\pm 0,18) \log P + 2,5(\pm 2,0) \sigma_{\text{H}} - 12(\pm 7,7) \quad \text{exp 4.6}$$

(n=15) ($R^2=0,695$) (s=0,46)

Deste modo, observa-se que a estabilidade dos compostos não depende de um único fator, mas da combinação de vários: lipofilia e polaridade. A expressão 4.6 permite concluir que a porção aciloxílica dos ésteres estudados apresenta um peso considerável na constante de *pseudo*-primeira ordem para a hidrólise no homogenato da micobactérias dos ésteres estudados. Verificou-se uma melhoria do coeficiente de correlação quando se considerou a dependência quadrática de $\log(k_{\text{obs}})$ com o $\text{p}K_{\text{aac}}$ da porção aciloxílica para a referida hidrólise - expressão 4.7.

$$\log(k_{\text{obs}}) = -3,1(\pm 0,68) \text{p}K_{\text{aac}} + 0,63(\pm 0,12) (\text{p}K_{\text{aac}})^2 + 3,1(\pm 0,91) \quad \text{exp. 4.7}$$

(n=15) ($R^2=0,858$) (s=0,30)

4.2 - Efeito da estrutura dos derivados do ácido benzóico nas atividades com as diferentes estirpes micobacterianas ensaiadas.

O efeito da estrutura dos ésteres derivados do ácido benzóico na correspondente atividade antimicobacteriana nas diferentes estirpes estudadas foi efetuada com base nos descritores indicados na Tabela 4.1. Parece existir uma relação entre a atividade e a lipofilia. De facto, estudos anteriores demonstraram que compostos mais lipofílicos apresentam maiores atividades.⁽⁸²⁾ Também se observou que quanto menor é o $\text{p}K_{\text{aac}}$, maior é a atividade antimicobacteriana.⁽³⁾ Para isso, e tal como anteriormente para os estudos de estabilidade, avaliou-se isoladamente o efeito da lipofilia através de $\log P$ e o efeito do $\text{p}K_{\text{aac}}$ da porção aciloxílica da molécula. Além disso, foram ainda determinados os descritores que mais poderiam influenciar as atividades observadas.

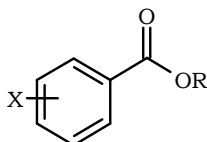
A atividade dos ésteres estudados foi avaliada com base nas pCMI dos referidos compostos para as diferentes estirpes nas condições estudadas a partir dos valores de CMI s (mM) apresentados nas Tabelas 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3, atendendo a que:

$$\text{pCMI} = -\log(\text{CMI}) \quad \text{exp. 4.8}$$

4.2.1. - Estudos de atividade em *M. smegmatis*

A Tabela 4.3 apresenta os valores de pCMI para a atividade em *M. smegmatis* dos compostos estudados aos dois valores de pH em que os ensaios foram realizados 6,5 e 5,9.

Tabela 4.3- Valores de pCMI calculados para os ésteres dos derivados do ácido benzóico em *M. smegmatis* a pH 6,5 e 5,9



Composto	X	R	<i>M.smegmatis</i>	
			pH 6,5	pH 5,9
			pCMI	pCMI
BP	H	-C ₃ H ₇	-0,38	-0,38
BF	H	-C ₆ H ₅	-0,31	-0,31
BH	H	-C ₆ H ₁₃	-0,29	-0,29
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,71	1,30
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	-0,46	0,77
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	-1,37	-1,37
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	-0,24	-0,24
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	0,08	0,08
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,02	0,02
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,085	0,085
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	-0,23	-0,23
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	0,13	0,13
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	-0,16	-0,16

4.2.1.1 - Estudos de atividade em *M. smegmatis* a pH = 6,5

Tal como com os estudos de estabilidade avaliou-se o efeito da lipofilia, $\log P$, e do pK_{aac} para a porção aciloxílica dos ésteres (Tabela 4.1) na atividade em *M. smegmatis* ao pH 6,5.

A dependência da atividade dos compostos, expressa como pCMI, e a lipofilia, avaliada como $\log P$, encontram na Figura 4.5:

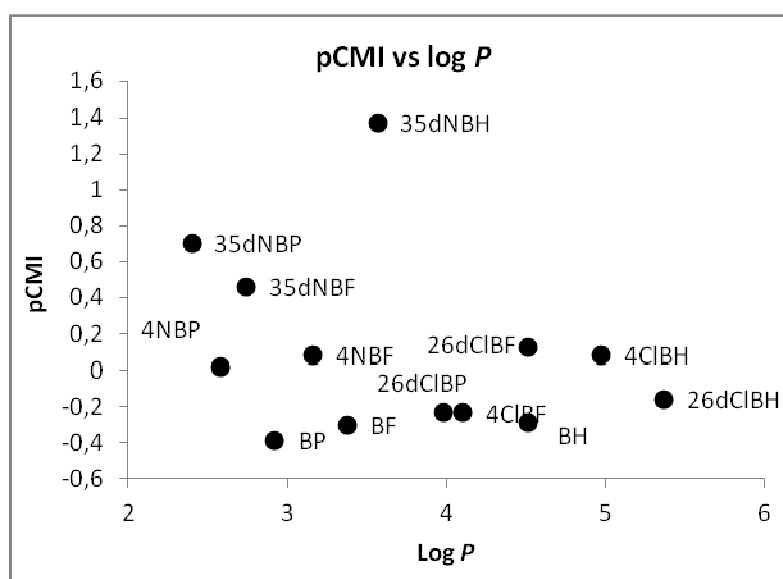


Figura 4.5- Relação entre o valor de pCMI em *M. smegmatis* a pH 6,5 e a lipofilia $\log P$.

Pela análise da Figura 4.5 verifica-se não haver qualquer correlação de pCMI para *M. smegmatis* a pH 6,5 e $\log P$ dos compostos estudados.

O efeito da porção aciloxílica, avaliado como pK_{aac} , da molécula nos pCMIs em *M. smegmatis* a pH 6,5 encontram expressas na Figura 4.6

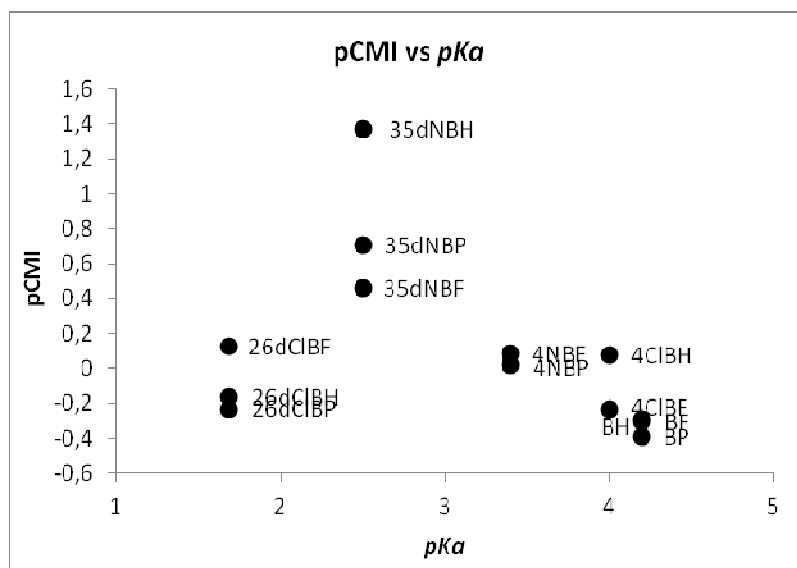


Figura 4.6- Relação entre pCMI para as atividades em *M. smegmatis* a pH 6,5 e pK_{aac}

Verifica-se não existir uma linha de tendência entre pCMI para as atividades em *M. smegmatis* a pH 6,5 e o pK_{aac} e assim tentou-se a combinação de vários descritores, de modo a avaliar quais terão maior relevância na atividade dos compostos estudados. Verificou-se existir uma correlação multiparamétrica de pCMI conjugando os descritores $\log P$ e pK_{aac} com σ_H , - expressão 4.9

$$pCMI = 0,16(\pm 0,11)\log P - 4,63(\pm 0,93)pK_{aac} - 4,56(\pm 0,96)\sigma_H + 18,74(\pm 3,64) \quad \text{exp. 4.9}$$

(n=13) ($R^2=0,793$) (s=0,26)

A expressão 4.9 mostra uma dependência linear de pCMI com aqueles três parâmetros, verificando-se que a correlação envolvendo os mesmos descritores melhorava sendo considerada a dependência quadrática com o parâmetro de Hammett σ_H - expressão 4.10

$$pCMI = 0,21(\pm 0,011)\log P - 3,31(\pm 1,08)pK_{aac} \pm 2,47(\pm 1,39)\sigma_H - 0,30(\pm 0,16)\sigma_H^2 + 12,8(\pm 4,48)$$

(n= 13) ($R^2=0,857$) (s=0,23)

exp .4.10

4.2.1.2 - Estudos de atividade em *M. smegmatis* a pH = 5,9

Tal como ao pH 6,5 tentou-se ver a influência da lipofilia, avaliada como $\log P$, bem como do pK_{aac} dos compostos em estudo na atividade dos ésteres para a mesma estirpe ao pH 5,9 - Figura 4.7 e Figura 4.8.

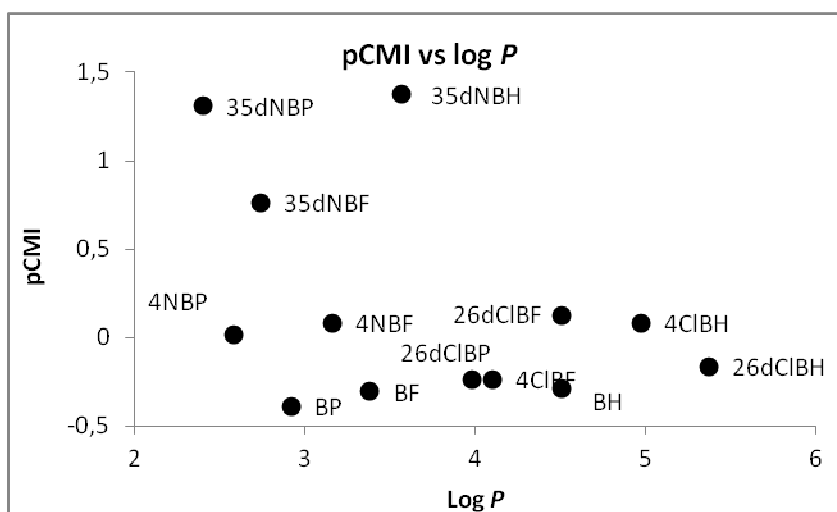


Figura 4.7- Relação entre o valor de pCMI em *M. smegmatis* a pH 5,9 e $\log P$.

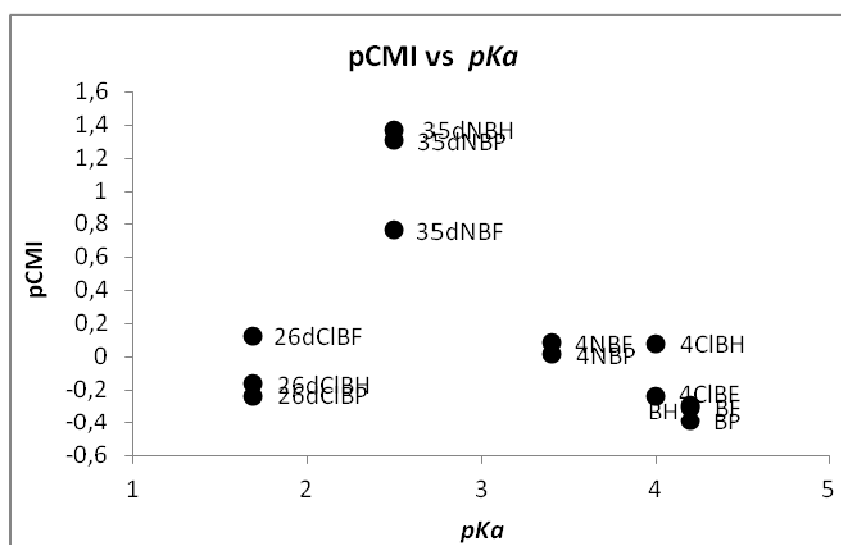


Figura 4.8 - Relação entre o valor de pCMI em *M. smegmatis* a pH 5,9 e o pK_{aac}

A análise das Figuras 4.7 e 4.8 permite concluir que se observam correlações fracas de pCMI ao pH 5,9 com ambos os descritores.

Conforme já referido anteriormente, à medida que o pK_{aac} diminui, aumenta a atividade antimicobacteriana. Isto pode ser observado no caso dos compostos com o

substituinte 3,5-dinitro na porção aciloxílica ($pK_{aac}=2,5$), que demonstraram ser os mais ativos (Tabela 3.2.1). Embora os compostos com o substituinte 2,6-dicloro possuam um valor de pK_{aac} mais baixo ($pK_{aac}=1,69$), do que os compostos com o substituinte 3,5-dinitro, no entanto os seus valores de CMI são maiores, devido ao impedimento estereoquímico gerado pelos dois grupos cloro na posição *orto*, conforme já havia sido constatado anteriormente (Tabela 3.2.1).

A conjugação dos dois descritores $\log P$ e pK_{aac} na atividade dos ésteres nesta micobactéria ao pH 5,9 conduziu a um ligeiro aumento no coeficiente de correlação, o qual aumentou consideravelmente quando se incluiu também o parâmetro de Hammett-expressão 4.11.

$$pCMI = 0,12(\pm 0,11)\log P - 5,59(\pm 0,83)pK_{aac} - 5,49(\pm 0,85)\sigma_H + 22,9(\pm 3,24) \quad \text{exp. 4.11}$$

(n= 13) ($R^2=0,89$) (s=0,23)

Com os mesmos descritores, verificou-se ainda um aumento do coeficiente de correlação ao considerar existir uma dependência quadrática da atividade dos ésteres estudados com parâmetro de Hammett - expressão 4.12.

$$pCMI = 0,16(\pm 0,09)\log P - 4,44(\pm 0,97)pK_{aac} - 3,67(\pm 1,25)\sigma_H - 0,26(\pm 0,14)\sigma_H^2 + 17,8(\pm 0,04)$$

(n= 13) ($R^2=0,92$) (s=0,21)

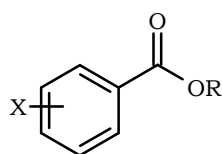
exp. 4.12

Deste modo, observa-se que a atividade dos compostos estudados em *M. smegmatis*, a ambos os pH testados depende para além da lipofilia dos ésteres, do pK_{aac} da porção aciloxílica das moléculas e ainda quadraticamente do parâmetro de Hammett σ_H .

4.2.2. - Estudos de atividade em *M. bovis* BCG:

Os valores de pCMI foram calculadas a partir dos valores de CMI (mM) apresentados na Tabela 3.2.2 para a estirpe *M. bovis* BCG com base na expressão 4.8. A Tabela 4.4 apresenta os valores de pCMI para cada composto nos dois valores de pH testados:

Tabela 4.4 - Valores de pCMI calculados para os ésteres dos derivados do ácido benzóico para o *M. bovis* BCG a pH 6,5 e pH 5,9.



Composto	X	R	<i>M. bovis</i> BCG	
			pH 6,5	pH 5,9
			pCMI	pCMI
BP	H	-C ₃ H ₇	-0,38	-0,38
BF	H	-C ₆ H ₅	-0,31	-0,31
BH	H	-C ₆ H ₁₃	-0,29	-0,29
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,41	1,31
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,76	0,76
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	1,07	1,38
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	0,36	-0,24
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	0,68	0,08
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,32	0,02
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,39	0,09
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	-0,23	-0,23
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	0,43	0,12
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	-0,16	-0,16

4.2.2.1 - Estudos de atividade em *M. bovis* a pH = 6,5

Tal como com os estudos de atividade em *M. smegmatis* avaliou-se o efeito da lipofilia, $\log P$, e do pK_{aac} para a porção aciloxílica dos ésteres (Tabela 4.1) na atividade em *M. bovis* BCG ao pH 6,5. A dependência da atividade dos compostos, expressa como pCMI (Tabela 4.4), e a lipofilia, avaliada como $\log P$, encontra-se indicada na Figura 4.9:

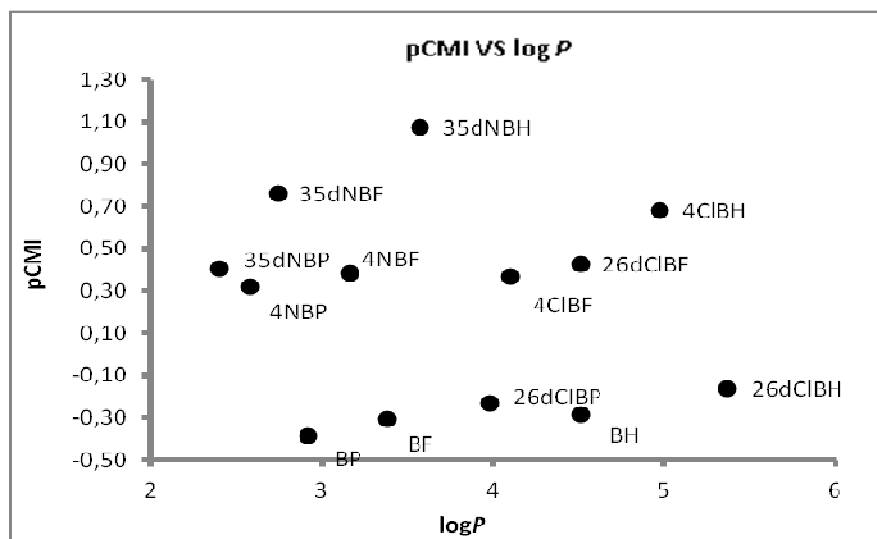


Figura 4.9 - Relação entre o valor de pCMI em *M. bovis* BCG a pH 6,5 e a lipofilia, $\log P$.

A análise da Figura 4.9 permite concluir que não se observa qualquer correlação entre a atividade dos ésteres ao pH testado com o $\log P$ dos compostos. A Figura 4.10 apresenta o efeito do pK_{aac} na atividade como pCMIs destes compostos em *M. bovis* BCG ao pH 6,5, não se observando também existir qualquer correlação.

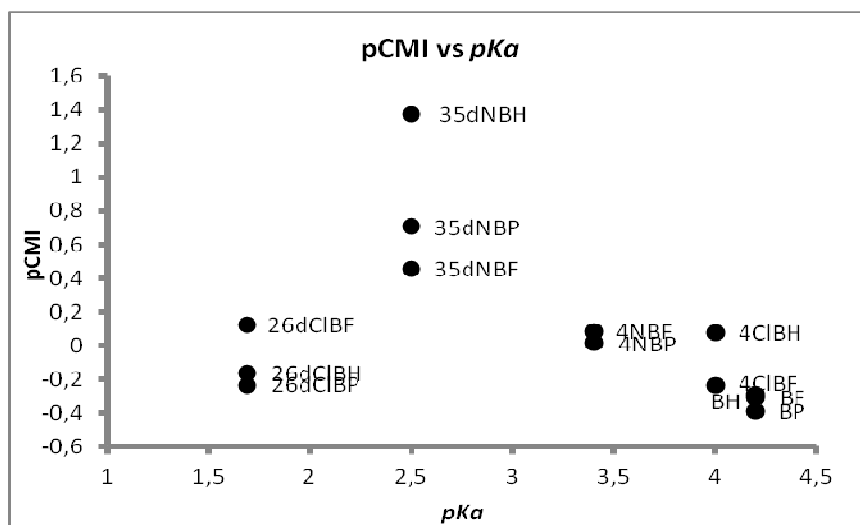


Figura 4.10 - Relação entre o valor de pCMI em *M. bovis* BCG a pH 6,5 e o pK_{aac} .

Uma vez que não se observaram correlações com qualquer dos dois parâmetros testados, $\log P$ e pK_{aac} , separadamente de pCMI em *M. bovis* ao pH 6,5 tentou-se ver a dependência da atividade tentando a combinação com vários parâmetros. Obteve-se uma correlação moderada considerando conjuntamente para além dos descritores $\log P$ e pK_{aac} ainda o parâmetro de Hammett σ_H e o parâmetro de polaridade de Taft, σ^* para a porção alcóxílica do éster - expressão 4.13.

$$pCMI = 0,36(\pm 0,22)\sigma^* - 4,0(\pm 1,43)\sigma_H + 0,26(\pm 0,11)\log P - 4,08(\pm 1,40)pK_{aac} + 16,2(\pm 5,45)$$

(n= 13) ($R^2=0,563$) (s=0,38)

exp. 4.13

Verificou-se no entanto um aumento do coeficiente de correlação considerando dependências quadráticas de pCMI com os dois descritores iniciais $\log P$ e pK_{aac} - expressão 4.14.

$$pCMI = 1,37(\pm 0,81)\log P - 0,14(\pm 0,1)\log P^2 + 4,73(\pm 0,97)pK_{aac} - 0,82(\pm 0,16)pK_{aac}^2 - 8,97(\pm 2,33)$$

(n=13) ($R^2=0,783$) (s=0,27)

exp. 4.14

4.2.2.2 - Estudos de atividade em *M. bovis* a pH = 5,9

Tal como ao pH 6,5 tentou-se ver a influência da lipofilia, avaliada como $\log P$, bem como do pK_{aac} dos compostos em estudo na atividade dos ésteres para a mesma estirpe ao pH 5,9 - Figura 4.11 e Figura 4.12.

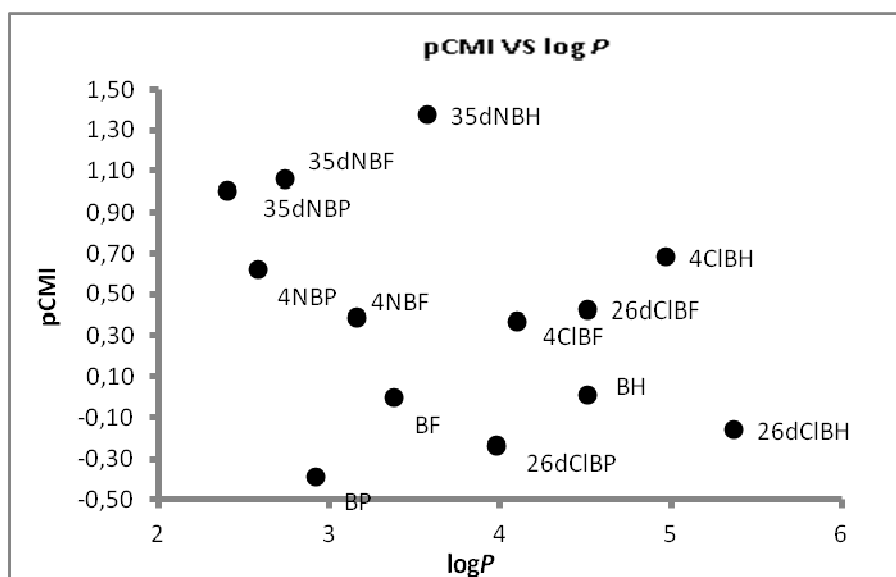


Figura 4.11 - Relação entre o valor de pCMI em *M. bovis* BCG a pH 5,9 e a lipofilia, $\log P$.

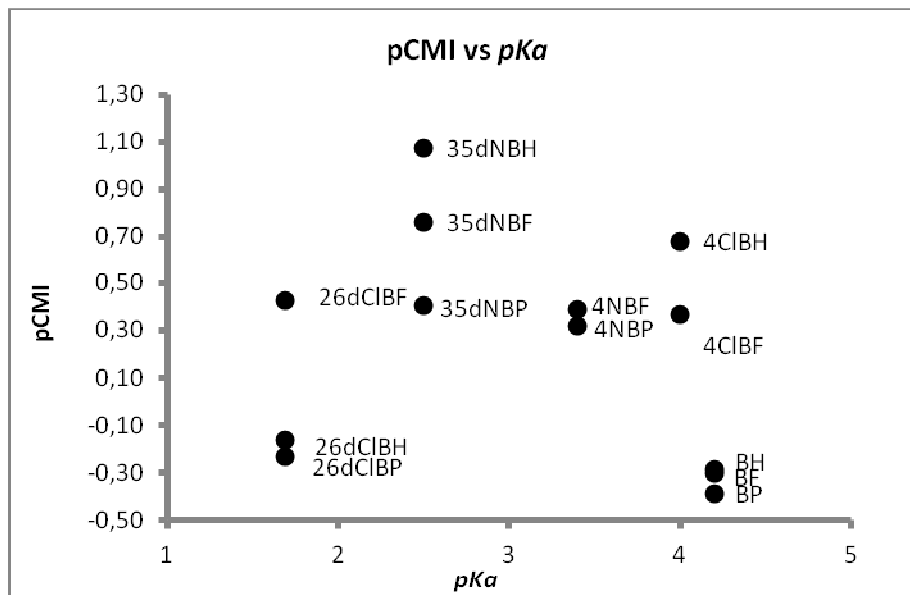


Figura 4.12 - Relação entre o valor de pCMI em *M. bovis* BCG a pH 5,9 e o pK_{aac} .

Tanto na Figura 4.11 como na Figura 4.12 não se observam quaisquer correlações entre o valor de pCMI com a lipofilia, $\log P$ ou com o valor de pK_{aac} dos ésteres estudados. Tal como com as atividades testadas ao pH 6,5 tentou-se ver a dependência da atividade com a combinação de vários parâmetros. Obteve-se uma correlação moderada considerando conjuntamente para além dos descritores $\log P$ e pK_{aac} ainda o parâmetro de Hammett σ_H e o parâmetro de polaridade de Taft, σ^* para a porção alcofílica do éster - expressão 4.15.

$$pCMI = -0,33(\pm 0,20)\sigma^* + 5,33(\pm 1,30)\sigma_H + 0,23(\pm 0,15)\log P + -5,31(\pm 1,27)pK_{aac} + 21,6(\pm 4,92)$$

(n= 13) ($R^2=0,736$) (s=0,34) exp. 4.15

Para as atividades testadas ao pH 5,9 verificou-se ainda que o coeficiente de correlação melhorava se para além dos descritores da expressão 4.15 fosse também considerado o parâmetro estereoquímico de Taft, E_{STaft} (Tabela 4.1) conforme se pode verificar pela expressão 4.16.

$$pCMI = 1,12(+0,72)E_{STaft} - 0,89(+0,40)\sigma^* - 5,99(+1,26)\sigma_H + 0,34(+0,15)\log P - 5,96(\pm 1,24)pK_{aac} + 23,7(\pm 4,72)$$

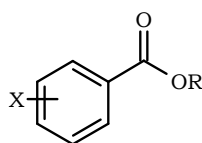
(n= 13) ($R^2=0,804$) (s=0,31) exp. 4.16

Verifica-se assim que a atividade dos compostos em *M. bovis* BCG, a ambos os valores de pH, depende da combinação de vários fatores avaliados por descritores indicativos de lipofilia, $\log P$ e de polaridade pK_{aac} , σ_H , σ^* , dos compostos e ainda de efeitos estereoquímicos, E_S Taft ao pH de 5,9.

4.3. - Estudos de atividade em *M. tuberculosis* Ra:

Os valores de pCMI para a atividade em *M. tuberculosis* Ra foram determinados pela expressão 4.8 com base nos valores de CMI (mM) apresentados na Tabela 3.2.3. A Tabela 4.4 apresenta os valores de pCMI para cada composto ao pH 6,5 testado:

Tabela 4.5 - Valores de pCMI calculados para os ésteres dos derivados do ácido benzóico para o *M.tuberculosis* H37Ra a pH 6,5.



Composto	X	R	<i>M. tuberculosis</i> Ra
			pH 6,5
			pCMI
BP	H	-C ₃ H ₇	-0,38
BF	H	-C ₆ H ₅	-0,004
BH	H	-C ₆ H ₁₃	-0,29
35dNBP	3,5-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,41
35dNBF	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₅	1,36
35dNBH	3,5-NO ₂	-C ₆ H ₁₃	1,38
4CIBF	4-Cl	-C ₆ H ₅	-0,24
4CIBH	4-Cl	-C ₆ H ₁₃	0,38
4NBP	4-NO ₂	-C ₃ H ₇	0,02
4NBF	4-NO ₂	-C ₆ H ₅	0,09
26dCIBP	2,6-Cl	-C ₃ H ₇	-0,23
26dCIBF	2,6-Cl	-C ₆ H ₅	0,13
26dCIBH	2,6-Cl	-C ₆ H ₁₃	0,14

4.3.1 - Estudos de atividade em *M. tuberculosis* Ra a pH = 6,5.

Avaliou-se o efeito da lipofilia como $\log P$ e ainda do pK_{aac} sobre a atividade como pCMI em *M. tuberculosis* Ra ao pH 6,5 - Figuras 4.13 e 4.14.

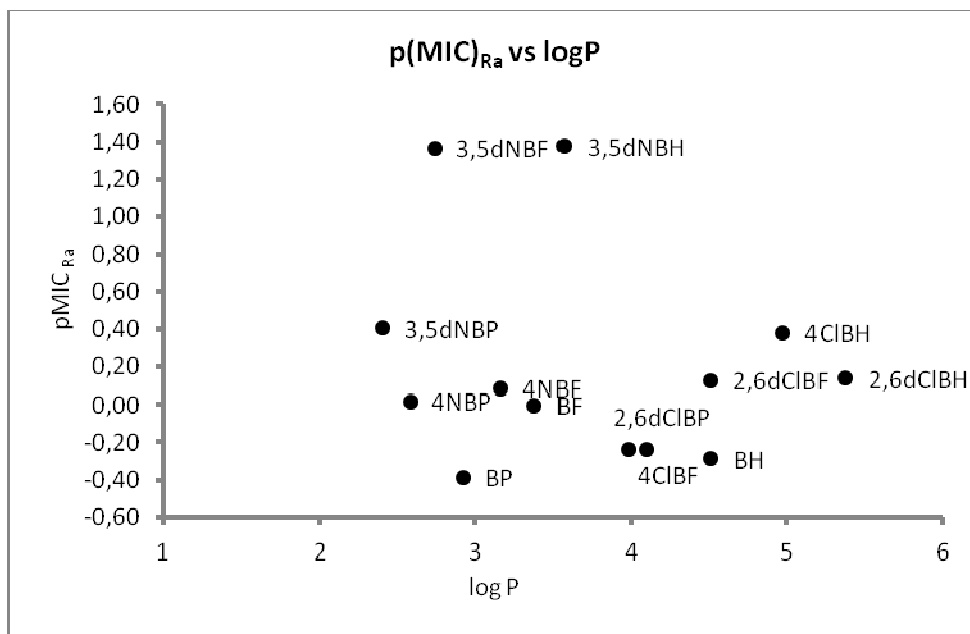


Figura 4.13 - Relação entre o valor de pCMI em *M. tuberculosis* H37Ra a pH 6,5 e a lipofilia, $\log P$.

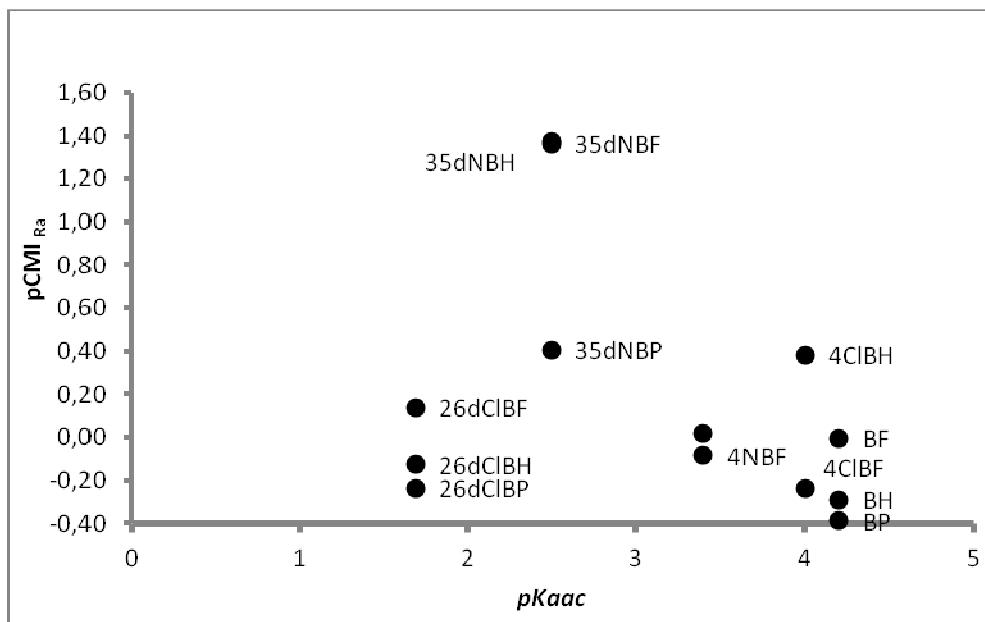


Figura 4.14 - Relação entre o valor de pCMI em *M. tuberculosis* H37Ra a pH 6,5 e pK_{aac} .

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram que não se observam correlações da atividade em *M. tuberculosis* Ra com qualquer dos descritores testados, $\log P$ e pK_{aac} .

Uma vez que não se observaram correlações de pCMI para *M. tuberculosis* Ra a pH 6,5 com os parâmetros log *P* e p*K*_{aac} isoladamente, tentou-se ver a dependência da atividade com outros descritores. Verificou-se que conjugando log *P* com p*K*_{aac} e σ_H de Hammett se obtinha uma correlação razoável - expressão 4.17.

$$\text{pCMI} = 0,25(\pm 0,13) \log P - 5,5(\pm 1,1) \text{p}K_{\text{aac}} - 5,5(\pm 1,1) \sigma_{\text{H}} + 22(\pm 4,3) \quad \text{exp. 4.17}$$

(n=13) (R²=0,782) (s=0,30)

A correlação melhorou quando se acrescentou o parâmetro estereoquímico de Taft, E_{S Taft} aos descritores da expressão anterior - expressão 4.18.

$$\text{pCMI} = 0,27(\pm 0,12) \log P - 5,7(\pm 1,0) \text{p}K_{\text{aac}} - 5,6(\pm 1,1) \sigma_{\text{H}} + 0,39(\pm 0,30) E_{\text{STaft}} + 23(\pm 4,1)$$

(n=13) (R²=0,821) (s=0,29) exp 4.18

Substituindo na correlação anterior o descritor referente à lipofilia, log *P*, pelo p*K*_{aga} do grupo alcóxilo abandonante obteve-se um melhor coeficiente de correlação - expressão 4.19.

$$\text{pCMI} = 0,83(\pm 0,30) \text{p}K_{\text{aga}} - 4,3(\pm 0,71) \text{p}K_{\text{aac}} - 4,1(\pm 0,72) \sigma_{\text{H}} + 8,9(\pm 3,1) E_{\text{STaft}} + 7,6(\pm 4,6)$$

(n=13) (R²=0,853) (s=0,27) exp 4.19

Verificou-se ainda que substituindo o parâmetro estereoquímico de Taft E_{S Taft} pelo parâmetro de Charton E_{Sn Cht} e mantendo os outros descritores, não se observou alteração no coeficiente de correlação obtido - expressão 4.20.

$$\text{pCMI} = -0,27(\pm 0,09) \text{p}K_{\text{aga}} - 4,3(\pm 0,71) \text{p}K_{\text{aac}} - 4,1(\pm 0,72) \sigma_{\text{H}} + 11(\pm 3,8) E_{\text{Sn Cht}} + 14(\pm 3,2) \quad \text{exp.4.20}$$

(n=13) (R²=0,853) (s=0,27)

Deste modo, verifica-se que a atividade dos compostos na estirpe *M. tuberculosis* Ra a pH 6,5 não depende de um único fator ou parâmetro, mas da combinação de vários descritores envolvendo lipofilia, polaridade e efeitos estereoquímicos.

4.4 Conclusão

Os resultados descritos anteriormente permitem concluir que a estrutura dos ésteres estudados tem influência tanto na estabilidade dos referidos compostos em plasma como na ativação observada em homogenato de micobactérias e ainda nas atividades *in vitro* testadas nas diferentes estirpes de micobactérias. De um modo geral verifica-se que em todos os estudos efetuados se observa uma dependência simultânea de vários fatores sendo obtidas correlações multiparamétricas. Aparentemente o fator que exercerá maior influência parece ser o pK_{aac} da porção aciloxílica do éster conjugado com o parâmetro de Hammett σ_H , e ainda com o parâmetro de polaridade de Taft σ^* para a porção alcoxílica do éster ou com $\log P$ que traduz a lipofília da molécula.

Relativamente às atividades antimicobacterianas dos ésteres testados verificou-se que os valores de pCMI avaliados para a estirpe *M. smegmatis* a ambos os pH, parecem ser fortemente influenciados pela lipofilia $\log P$, pelo pK_{aac} para a porção aciloxílica do éster, e pelo parâmetro de Hammett σ_H , demonstrando uma dependência quadrática com σ_H e linear com $\log P$ e pK_{aac} . Aparentemente a atividade desta estirpe de micobactérias apresenta uma mesma dependência com os descritores testados não se alterando com a variação do pH a que os ensaios foram realizados.

No caso do *M. bovis* BCG, os parâmetros que parecem exercer maior influência sobre os valores de pCMI avaliados a ambos os pH são $\log P$, pK_{aac} , σ_H e σ^* de Taft, verificando-se no entanto existir um coeficiente de correlação melhor nos ensaios a pH 5,9. Nos ensaios efetuados ao pH 6,5 concluiu-se que os descritores $\log P$ e pK_{aac} terão aparentemente um peso maior na atividade dos compostos testados uma vez que se observou existir uma dependência quadrática de pCMI com ambos esses descritores - expressão 4.14. Ao pH 5,9 observou-se para esta estirpe uma melhoria na correlação quando o parâmetro estereoquímico de Taft E_{STaft} foi adicionado aos descritores anteriores - expressão 4.16.

A atividade dos ésteres estudados em *M. tuberculosis* Ra ao pH 6,5 apresentou um melhor coeficiente de correlação quando para além de pK_{aac} para a porção aciloxilo do éster e do parâmetro de Hammett σ_H foi incluído o pK_{aga} para o grupo abandonante e ainda um descritor para a estereoquímica quer seja o parâmetro estereoquímico de Taft

E_{sTaft} ou o parâmetro de Charton $E_{SV\ Cht}$ que conduzem ambos ao mesmo coeficiente de correlação - expressões 4.19 e 4.20.

Em suma, verifica-se que foram obtidas dependências multiparamétricas em todos os estudos efetuados. Assim, no desenvolvimento de derivados do ácido benzóico como possíveis fármacos contra a tuberculose, deve-se ter em conta tanto os fatores lipofílicos, e ainda fatores estereoquímicos e de polaridade.

5.CONCLUSÃO

5.Conclusão

Nos ensaios de estabilidade efetuados, observa-se de uma maneira geral que os compostos com o substituinte 2,6-dicloro são os que apresentam as hidrólises mais lentas, enquanto os compostos sem qualquer substituinte apresentam as hidrólises mais rápidas. Este facto verifica-se tanto nos ensaios realizados em tampão fosfato aos dois valores de pH estudados como nos dois meios biológicos testados. Os estudos de estabilidade em tampão fosfato permitiram concluir que a hidrólise química dos ésteres estudados é bastante mais lenta que a hidrólise enzimática nos dois meios biológicos testados e inferior ao correspondente desvio padrão, como se pode verificar pelas Tabelas 3.1.3 e 3.1.4. Os ensaios nos meios biológicos testados permitiu concluir que o desaparecimento do éster conduziu sempre ao aparecimento do correspondente ácido, confirmando a ocorrência de processos de hidrólise enzimática, como se pode comprovar pelas Figuras 3.1.3 a 3.1.16 para a hidrólise em plasma dos referidos compostos e pelas Figuras 3.1.18 a 3.1.29 em homogenato de micobactérias nas condições estudadas. As Figuras 3.1.2 a 3.1.3 são exemplo do processo de hidrólise química observada em tampão fosfato para alguns dos ésteres estudados mostrando o aparecimento do ácido em simultâneo com o desaparecimento do substrato éster.

A introdução de substituintes atratores de eletrões na porção aciloxílica do éster conduziu de um modo geral ao aumento da estabilidade dos compostos em ambos os meios biológicos - Tabela 3.1.5 - sendo esse aumento de estabilidade mais notado com os ésteres fenílicos. A introdução dos grupos 3,5-dinitro no anel aromático da porção aciloxílica conduziu ao aumento generalizado da estabilidade para todos os ésteres em ambos os meios biológicos estudados independentemente da cadeia alcoxílica desses ésteres. Este facto poderá estar relacionado com o decréscimo do pK_{aac} para o grupo aciloxilo do éster observado pela introdução desses substituintes no anel aromático ($pK_{aac} = 2,5$) como se pode verificar pela Tabela 4.1 dificultando a hidrólise dos referidos ésteres. No entanto o maior aumento de estabilidade em plasma dos ésteres estudados observou-se com a introdução de átomos de cloro nas posições 2 e 6 do anel aromático do grupo acilo conduzindo a um aumento de estabilidade em comparação com o éster não substituído, o que poderá ser também explicado não só pelo decréscimo

no pK_{aac} da porção aciloxílica do éster ($pK_{aac} = 1,69$) mas ainda pelo impedimento estereoquímico introduzido pelos referidos substituintes.

Além dos compostos estudados serem estáveis em plasma, e sofrerem ativação nas micobactérias, estes necessitam de ser ativos quando chegam ao seu local de ação.

Quanto aos estudos de atividade, é possível constatar que nas três estirpes de micobactérias, os compostos com grupos 3,5-dinitro na porção aciloxílica são aqueles que possuem maior atividade- Tabelas 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3. Este facto poderá estar relacionado com o pK_a deste grupo acilo ($pK_{aac} = 2,5$), uma vez quanto menor é o pK_a , mais forte é o ácido e maior será atividade, levando à formação de mais espécies ionizadas, que se acumulam no interior da célula, aumentando assim a atividade. Por outro lado, os compostos menos ativos são os que possuem o substituinte 2,6-dicloro ou que não possuem qualquer substituinte na porção aciloxílica, como se pode observar nas Tabelas 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 Embora a introdução destes substituintes provoque um decréscimo no pK_{aac} da porção aciloxílica do éster ($pK_{aac} = 1,69$), o impedimento estereoquímico terá maior influência, o que leva a um aumento da estabilidade do éster e portanto a uma menor formação do ácido livre, sendo o pró-fármaco mais dificilmente ativado. Uma vez formado o ácido livre, as espécies ionizadas formam-se facilmente pois o ácido é mais forte.

Adicionalmente, os valores de CMI obtidos a pH 5,9 são menores ou iguais em relação aos valores obtidos para 6,5 nas estirpes estudadas, o que comprova as constatações expressas na literatura de que os ésteres derivados do ácido benzóico seriam mais ativos a pH ácido ^(46,54)

Sendo a espécie *M.tuberculosis* Ra mais indicada que a *M.bovis* ou *M. smegmatis* no screening de fármacos para o tratamento da tuberculose, é importante verificar que os valores de CMI, para esta estirpe serão mais baixos que para as outras duas estirpes estudadas é indicativo que estes compostos serão potenciais pró-fármacos para o tratamento da tuberculose. Com base nos resultados obtidos para esta estirpe, poder-se-á seleccionar dos derivados estudados os compostos que poderão ser utilizados em estudos futuros.

Em suma, os compostos com o substituinte 2,6-dicloro demonstraram possuir elevada estabilidade nos meios biológicos mas pouco ativos nas micobactérias em virtude do impedimento estereoquímico provocado pelos grupos cloro nas posições 2 e 6. Por outro lado, os compostos que apresentam a melhor relação entre atividade e estabilidade são os que possuem o substituinte 3,5-dinitro.

Os resultados obtidos demonstraram que a estrutura da molécula pode influenciar tanto a sua atividade como a sua estabilidade. No entanto, essa influência depende simultaneamente de vários fatores, traduzidos por correlações multiparamétricas, como se verificou no Capítulo 4. No caso da estabilidade, os fatores que exercerão maior influência parecem ser o pK_{aac} da porção aciloxílica do éster combinado com o parâmetro de Hammett σ_H , e ainda com o parâmetro de polaridade de Taft σ^* para a porção alcoxílica do éster ou com $\log P$ que traduz a lipofilia da molécula.

Em relação à atividade, os descritores moleculares que exercem maior influência variam entre as estirpes. Os valores de pCMI obtidos para a estirpe *M. smegmatis*, a ambos os pH, parecem ser fortemente influenciados por $\log P$ que traduz a lipofilia dos compostos, conjugado com pK_{aac} para a porção aciloxílica do éster, e com o parâmetro de Hammett σ_H , demonstrando uma dependência quadrática com σ_H e linear com $\log P$ e pK_{aac} . Por outro lado, os valores de pCMI obtidos para estirpe *M. bovis* BCG, parecem ser influenciados pelo $\log P$, pK_{aac} , σ_H e σ^* de Taft, tendo-se obtido melhores correlações a pH 5,9 e quando se introduz o parâmetro estereoquímico E_{STaft} - expressão 4.16. No caso do *M. tuberculosis* Ra, a atividade parece ser influenciada pelo pK_{aac} para a porção aciloxilo do éster combinado com o parâmetro de Hammett σ_H , o pK_{aga} para o grupo abandonante e o parâmetro estereoquímico de Taft E_{sTaft} ou o parâmetro de Charton $E_{Sv\ Cht}$ - expressões 4.19 e 4.20.

Assim, ao desenvolver derivados do ácido benzóico, deve-se considerar a influência do substituinte do grupo aciloxílico e também da cadeia alcoxílica, em simultâneo. Além disso, devem-se considerar não só os efeitos que estas porções podem exercer entre si, no pró-fármaco mas também as interações destas com os locais de ligação às moléculas alvo.

De um modo geral, pode-se dizer que foi alcançado o objetivo estipulado: selecionar pró-fármacos derivados do ácido benzóico estáveis em plasma humano e capazes de sofrer ativação nas micobactérias, sem comprometer a sua atividade. No entanto, será necessário estudar posteriormente o efeito de primeira passagem destes compostos no fígado e a consequente hidrólise pelas enzimas hepáticas, de modo a avaliar o seu metabolismo hepático. Além disso, serão necessários estudos de atividade em macrófagos infetados pelas micobactérias, de modo a selecionar quais os compostos mais ativos,. Também será interessante realizar ensaios em lipossomas, de modo a

avaliar o melhor tipo de transporte deste pró-fármacos até às micobactérias e para o interior das células. Por fim torna-se muito importante estudar a toxicidade destes compostos sobre células de mamíferos, o que deverá ser feito logo que possível

6.BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

1. WHO global tuberculosis control report 2010. Summary. *Cent Eur J Public Health*. 2010 Dec;18(4):237.
2. Arbex MA, Varella MDL, de Siqueira HR, de Mello FAF. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*. 2010 Sep-Oct;36(5):626-40.
3. Zhang Y, Zhang H, Sun Z. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):56-60.
4. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Nov;52(5):790-5.
5. Gu P, Constantino L, Zhang Y. Enhancement of the antituberculosis activity of weak acids by inhibitors of energy metabolism but not by anaerobiosis suggests that weak acids act differently from the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *J Med Microbiol*. 2008 Sep;57(Pt 9):1129-34.
6. Simoes MF, Valente E, Gomez MJ, Anes E, Constantino L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *Eur J Pharm Sci*. 2009 Jun 28;37(3-4):257-63.
7. Ryan KJ RC. *Sherrie Medical Microbiology* 4th ed. Hill. M, editor 2004.
8. Ghosh Jaydip PL, Bhupender Singh, B M Fredrik Pettersson, Nurul M Islam, Sailendra Nath Sarkar, Santanu Dasgupta, y Leif A Kirsebom. Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 30 June;106(26):10781-1078.
9. Snyder EE, Kampanya N, Lu J, Nordberg EK, Karur HR, Shukla M, et al. PATRIC: the VBI PathoSystems Resource Integration Center. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D401-6.
10. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian Journal Medical Respiratory*. 2012 October 290-304, 2004;120:290-304.
11. Holland SM. Nontuberculous Mycobacteria. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2001;321(1):49-55.
12. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesseling A, Engelke E, de Kock M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 Jul;10(7):818-22.
13. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):716-46.
14. Park SW, Hwang EH, Park H, Kim JA, Heo J, Lee KH, et al. Growth of mycobacteria on carbon monoxide and methanol. *Journal of Bacteriology*. 2003 Jan;185(1):142-7.
15. Gordon RE, Smith MM. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *Journal of Bacteriology*. 1953 Jul;66(1):41-8.
16. Grange JMMDYalNdK. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex: World Health Organization; 1996.
17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=89.
18. Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1475-8.
19. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2002(31):46S-54S.

20. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. 2001;2(3):164-8.
21. Coll P. [Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003 Jun-Jul;21(6):299-307; quiz 8, 26.
22. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):91-7.
23. Wang L, Slayden RA, Barry CE, 3rd, Liu J. Cell wall structure of a mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids. *J Biol Chem*. 2000 Mar 10;275(10):7224-9.
24. He Z, De Buck J. Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. *BMC Microbiol*. 2010;10:121.
25. Brennan PJ, Crick DC. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(5):475-88.
26. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008 Mar;88(2):85-6.
27. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends in Microbiology*. 2010 Mar;18(3):109-16.
28. Schulz GE. Bacterial porins: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Aug;5(4):701-7.
29. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Jun;12(3):215-23.
30. Niederweis M. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol*. 2003 Sep;49(5):1167-77.
31. Sharbati-Tehrani S, Stephan J, Holland G, Appel B, Niederweis M, Lewin A. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 2005 Jul;151(Pt 7):2403-10.
32. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):679-91.
33. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):20-30.
34. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004 Oct;120(4):213-32.
35. Jordao L, Bleck CK, Mayorga L, Griffiths G, Anes E. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell Microbiol*. 2008 Feb;10(2):529-48.
36. Vandal OH, Nathan CF, Ehrt S. Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 2009 Aug;191(15):4714-21.
37. Dheda K, Schwander SK, Zhu BD, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010 Apr;15(3):433-50.
38. Kaufmann SH, McMichael AJ. Annuling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S33-44.
39. Saúde DGd. Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose: Ponto da situação epidemiológico e de desempenho. Portugal 2010.
40. Valente E. β -lactamas como inibidores de proteases de serina e activação de pró-fármacos por esterases. Lisboa: Lisboa; 2009.
41. Arbex MA, Varella MDL, de Siqueira HR, de Mello FAF. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second line drugs. *J Bras Pneumol*. 2010 Sep-Oct;36(5):641-56.
42. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Feb;46(2):267-74.
43. Arbex MA, Varella Mde C, Siqueira HR, Mello FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol*. 2010 Oct;36(5):626-40.

44. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Nov;13(11):1320-30.
45. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2003 Jan;7(1):6-21.
46. Schroeder EK, de Souza N, Santos DS, Blanchard JS, Basso LA. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002 Sep;3(3):197-225.
47. Patrick GL, editor. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4 ed. New York: Oxford; 2009.
48. Janin YL. Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg Med Chem*. 2007 Apr 1;15(7):2479-513.
49. Saz AK, Bernheim F. The Effect of Benzoic Acid and Related Compounds on the Growth of Certain *Mycobacteria*. *J Bacteriol*. 1942 Sep;44(3):385-6.
50. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=243&loc=ec_rcs.
51. Mc Dermott W T, R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environment in vitro. *American Review of Tuberculosis*. 1954;70(4):748-54.
52. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol*. 2002 Jan;51(1):42-9.
53. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*. 1999 Apr;181(7):2044-9.
54. Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Jul;37(7):1393-9.
55. Rottenberg H. The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles, and vesicles. *Methods Enzymol*. 1979;55:547-69.
56. Rao M, Streur TL, Aldwell FE, Cook GM. Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology*. 2001 Apr;147(Pt 4):1017-24.
57. Albert A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature*. 1958;182(4633):421-3.
58. Chung MCAF, Elizabeth Igne. The latention process in drug design. *Química Nova*. 1999;22(1):75-84.
59. Silva ATD, Chung MC, Castro LF, Guido RVC, Ferreira EI. Advances in prodrug design. *Mini-Rev Med Chem*. 2005 Oct;5(10):893-914.
60. Chung MC, Silva AT, Castro LF, Guido VC, Nassute JC, Ferreira EI. Latention and advanced drug transport forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;41(2):155-78.
61. Francisco AP. *Profármacos mútuos de triazenos antitumorais*. Tese de doutoramento. Portugal: Universidade de Lisboa; 2004.
62. Valente E, Simoes MF, Testa B, Constantino L. Development of a method to investigate the hydrolysis of xenobiotic esters by a *Mycobacterium smegmatis* homogenate. *J Microbiol Methods*. 2011 May;85(2):98-102.
63. Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci*. 2006 Jun;95(6):1177-95.
64. Testa B, Mayer J. *Hydrolysis in Drug and Prodrug metabolism: Chemistry, Biochemistry and Enzymology*. 1st ed. Zurich: Wiley-VCH GmbH & Co, KGaA and Veriag Hekvetica Chimica Acta; 2003.
65. Price N. *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of Catalytic Proteins*. 3 ed. New York: Oxford University Press; 2009.
66. Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie*. 2000 Nov;82(11):1033-41.

67. Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: Challenges to the discovery scientist. *Curr Drug Metab.* 2003 Dec;4(6):461-85.
68. Wheelock CE, Shan G, Ottea J. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science.* 2005;30(2):75-83.
69. Wheelock C, Nakagawa Y. Carboxylesterases - from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure-activity relationship, and use in environmental field monitoring. *J Pesticide Sciences.* 2010;35(3):215-7.
70. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules.* 2008;13(2):412-31.
71. Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis DL. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure.* 1999 Jun 15;7(6):R141-6.
72. Satoh T, Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 1998;38:257-88.
73. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology.* [doi: 10.1016/j.bcp.2005.09.002]. 2005;70(11):1673-84.
74. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews.* [doi: 10.1021/cr00081a005]. 1987 1987/10/01;87(5):955-79.
75. Bozyczko-Coyne D, Williams M. 6.08 - Neurodegeneration. In: Editors-in-Chief: John BT, David JT, editors. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* Oxford: Elsevier; 2007. p. 193-228.
76. Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* [doi: 10.1016/j.abb.2009.12.005]. 2010;494(2):107-20.
77. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Sep;155(3):219-29.
78. Salvi A, Carrupt PA, Mayer JM, Testa B. Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acid. *Drug Metab Dispos.* 1997 Apr;25(4):395-8.
79. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012 Jun;33(3):209-90.
80. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol.* 2007 Feb;157(2):348-55.
81. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 Jun 11;393(6685):537-44.
82. Cotes K, Bakala N'goma J C, Dhouib R, Douchet I, Maurin D, Carriere F, et al. Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Apr;78(5):741-9.
83. Zhang Y, Chen C, J. L, *et al*. Complete Genome Sequences of *Mycobacterium tuberculosis* Strains CCDC5079 and CCDC5080, Which Belong to the Beijing Family. *Journal of Bacteriology.* 2011 Oct 4;193(19):5591-2.
84. Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* 2000;82(11):1033-41.
85. Svendsen A. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000;1543(2):223-38.
86. Zhang M, Wang J-d, Li Z-f, Xie J, Yang Y-p, Zhong Y, et al. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification.* 2005;42(1):59-66.

87. Guo J, Zheng X, Xu L, Liu Z, Xu K, Li S, et al. Characterization of a novel esterase Rv0045c from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2010;5(10).
88. Shen G, Singh K, Chandra D, Serveau-Avesque C, Maurin D, Canaan S, et al. LipC (Rv0220) is an immunogenic cell surface esterase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):243-53.
89. Brust B, Lecoufle M, Tuailon E, Dedieu L, Canaan S, Valverde V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(9):e25078.
90. Mackowiak PA. Brief history of antipyretic therapy. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct;31 Suppl 5:S154-6.
91. Ratledge C, Winder FG. Biosynthesis and utilization of aromatic compounds by *Mycobacterium smegmatis* with particular reference to the origin of salicylic acid. *Biochem J*. 1966 Nov;101(2):274-83.
92. Gale GA, Kirtikara K, Pittayakhajonwut P, Sivichai S, Thebtaranonth Y, Thongpanchang C, et al. In search of cyclooxygenase inhibitors, anti-*Mycobacterium tuberculosis* and anti-malarial drugs from Thai flora and microbes. *Pharmacol Ther*. 2007 Sep;115(3):307-51.
93. Adilakshmi T, Ayling PD, Ratledge C. Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2000 Jan;182(2):264-71.
94. Simões M. Desenvolvimento de pró-fármacos derivados da pirazinamida para tratamento de micobacterioses e estudo do efeito combinado com anti-inflamatório não esteróides. Lisboa: Lisboa; 2009.
95. Wade MM, Zhang Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Nov;58(5):936-41.
96. Shakoor S, Ahsan T, Jabeen K, Raza M, Hasan R. Use of p-nitrobenzoic acid in 7H10 agar for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a field study [Short communication]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2010;14(12):1644-6.
97. Giampaglia CMS, Martins MC, Chimara E, Oliveira RS, de Oliveira Vieira GB, Marsico AG, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with -nitrobenzoic acid using MGIT960. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2007;11(7):803-7.
98. Murray MF. Nicotinamide: An Oral Antimicrobial Agent with Activity against Both *Mycobacterium tuberculosis* and Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*. 2003 February 15, 2003;36(4):453-60.
99. Almeida T. Desenvolvimento de pró-fármacos do ácido pirazinóico por esterases de micobactérias. Lisboa2011.
100. Kumar P, Narasimhan B, Yogeewari P, Sriram D. Synthesis and antitubercular activities of substituted benzoic acid N'-(substituted benzylidene/furan-2-ylmethylene)-N-(pyridine-3-carbonyl)-hydrazides. *Eur J Med Chem*. 2010 Dec;45(12):6085-9.
101. Joshi SD, Vagdevi HM, Vaidya VP, Gadaginamath GS. Synthesis of new 4-pyrrol-1-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring systems: a novel class of potential antibacterial and antitubercular agents. *Eur J Med Chem*. 2008 Sep;43(9):1989-96.
102. Valente E. β -lactamas como inibidores de proteases de serina e activação de pró-fármacos por esterases. Tese de doutoramento. Lisboa2009.
103. Wallace RJ, Jr., Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol*. 1986 Dec;24(6):976-81.
104. Bergmann KE, Cynamon MH, Welch JT. Quantitative structure-activity relationships for the in vitro antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters. *J Med Chem*. 1996 Aug 16;39(17):3394-400.

105. Taft RW. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and o-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Esters1. J Am Chem Soc. [doi: 10.1021/ja01132a049]. 1952 1952/06/01;74(12):3120-8.
106. Perrin DD, Dempsey B, Serjeant EP. pKa prediction for organic acids and bases Chapman and Hall; 1981.
107. Sigman MS, Miller JJ. Examination of the role of Taft-type steric parameters in asymmetric catalysis. J Org Chem. 2009 Oct 16;74(20):7633-43.
108. Programa para cálculo do pKa: <http://lbmlc2.chem.uga.edu/sparc/>. 2009.
109. Programa de cálculo log P: AlogPS 2.1 program <http://vclab.org/>. 2009.

7.ANEXOS

Anexo I-Cálculos para a preparação das soluções de tampão fosfato de pH =7,4 e pH = 5,9 com concentração total 0,05M e força iónica 0,15M.

a. Solução de pH = 7,4

Para preparar a solução tampão fosfato pH=7,4 de concentração total 0,05M e força iónica 0,15M, prepararam-se soluções 0,2M de dihidrogenoortofosfato de sódio - NaH_2PO_4 e de hidrogenofosfato disódico - Na_2HPO_4 e ainda uma solução 1M de perclorato de sódio - NaClO_4 , utilizada para acerto final da força iónica.

Os cálculos são baseados nas seguintes equações: ⁽¹⁰⁶⁾

$$pK_a' = pK_a - (2n-1) \times \text{corr} \Leftrightarrow pK_a' = 7,2 - 3 \times 0,1235$$

Sendo:

$$n=2$$

$$pK_a (\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}) = 7,2$$

Dado que:

$$\text{pH} = pK_a' + \log \frac{a}{b}$$

$$a+b= 0,05\text{M}$$

a- espécies ácidas (H_2PO_4^-) b- espécies básicas (HPO_4^{2-})

• Força iónica

$$I = \sum_i c_i \times z_i^2$$

c-concentração das espécies iónicas em solução

z- carga das espécies iónicas em solução

Para preparar as soluções tampão com pH=7,4 de concentração 0,05M e força iónica 0,15M, pipetou-se para um balão volumétrico de 50mL:

- 2,65 mL de NaH_2PO_4 0,2M;

- 9,85 mL de solução Na_2HPO_4 0,2M e

- 1,06 mL da solução NaClO_4 1M,

Obtendo-se um volume total de 13,65 mL que se fez aos 50 mL com água desionizada.

b. pH = 5,9

Para fazer as soluções tampão com pH=5,9 de concentração total 0,05M e força iónica 0,15M.

Os cálculos são baseados nas seguintes equações:

$$pK_a' = pK_a - (2n-1) \times \text{corr} \Leftrightarrow pK_a' = 7,2 - 3 \times 0,1235$$

Sendo:

$$n=2$$

$$pK_a (\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}) = 7,2$$

$$\text{pH} = pK_a' + \log \frac{a}{b}$$

$$a+b = 0,05\text{M}$$

a- espécies ácidas (H_2PO_4^-) e b- espécies básicas (HPO_4^{2-})

- Força iónica

$$I = \sum_i c_i \times z_i^2$$

c-concentração das espécies iónicas em solução

z- carga das espécies iónicas em solução

Para preparar as soluções tampão com pH=5,9 de concentração total 0,05M e força iónica 0,15M, pipetou-se para um balão volumétrico de 50 mL:

- 11,18 mL de NaH_2PO_4 0,2M;
- 1,32 mL de solução Na_2HPO_4 0,2M e
- 4,47 mL da solução NaClO_4 1M,

Obtendo-se um volume total de 16,97 mL que se fez aos 50 mL com água desionizada.

Anexo II- Curvas de calibração

As curvas de calibração foram traçadas determinando as áreas obtidas no sistema de HPLC utilizado para diferentes concentrações dos compostos em estudo. A gama de concentrações utilizada situou-se entre 10^{-3} M e 10^{-6} M. Cada concentração foi analisada em duplicado. Como exemplo, apresenta-se a reta de calibração obtida para o éster 4NBF (Figura AII.1).

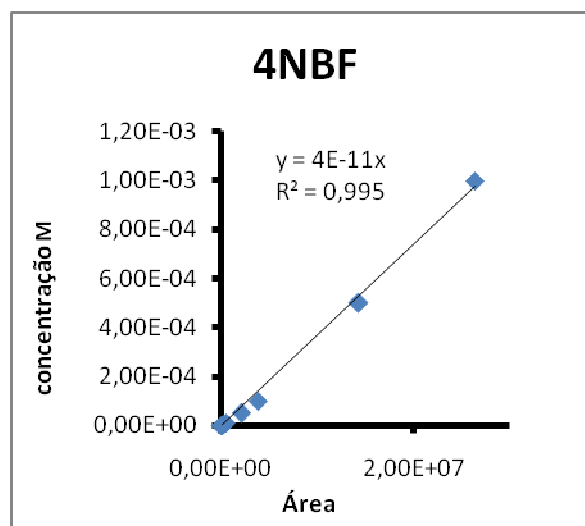


Figura A II.1- Reta de calibração do 4-nitrobenzoato de fenilo no eluente 60% ACN/ 40% Fase aquosa.

Apresenta-se a título de exemplo um dos cromatogramas obtido para o referido composto na concentração 5×10^{-6} M (Figura A II.2).

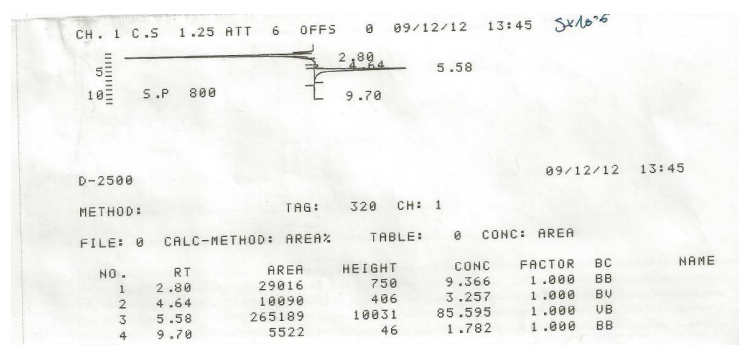


Figura A II.2 - Injecção da concentração 5×10^{-6} M do composto 4-nitrobenzoato de fenilo

Com base nas curvas de calibração obtidas, foi possível determinar a evolução da concentração dos diferentes compostos estudados ao longo do tempo nos diferentes ensaios de estabilidade efetuados.

Anexo III-Estabilidade dos ácidos benzóico, 3,5-dinitro-benzóico e 2,6-diclorobenzóico em tampão fosfato 7,4.

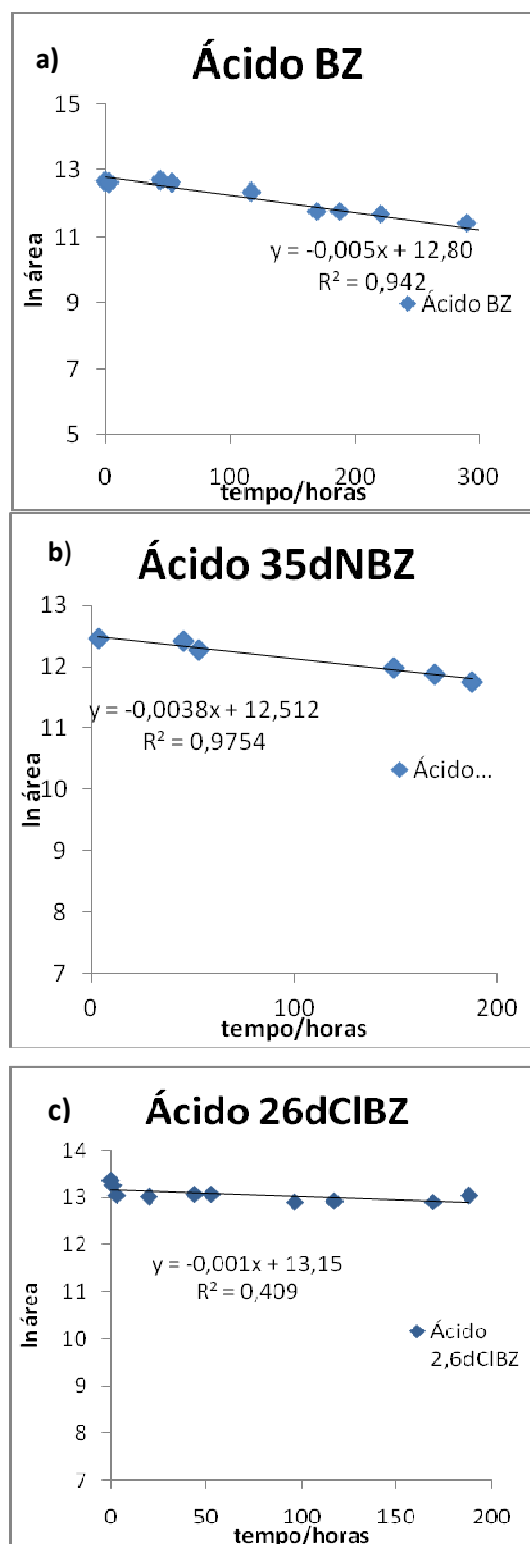


Figura A.III.1- Estabilidade dos ácidos benzóico (a), 3,5-dinitrobenzóico (b) e 2,6-diclorobenzóico (c) em tampão fosfato pH=7,4 (Ct=0,05M, I=0,15M). Os ensaios foram realizados em triplicado a T=37°C, com 2% acetonitrilo e com Ci=5×10⁻⁴M.

Anexo IV- Evolução das percentagens de espécies para os ésteres derivados do ácido benzóico em tampão pH 7,4 e tampão pH 5,9.

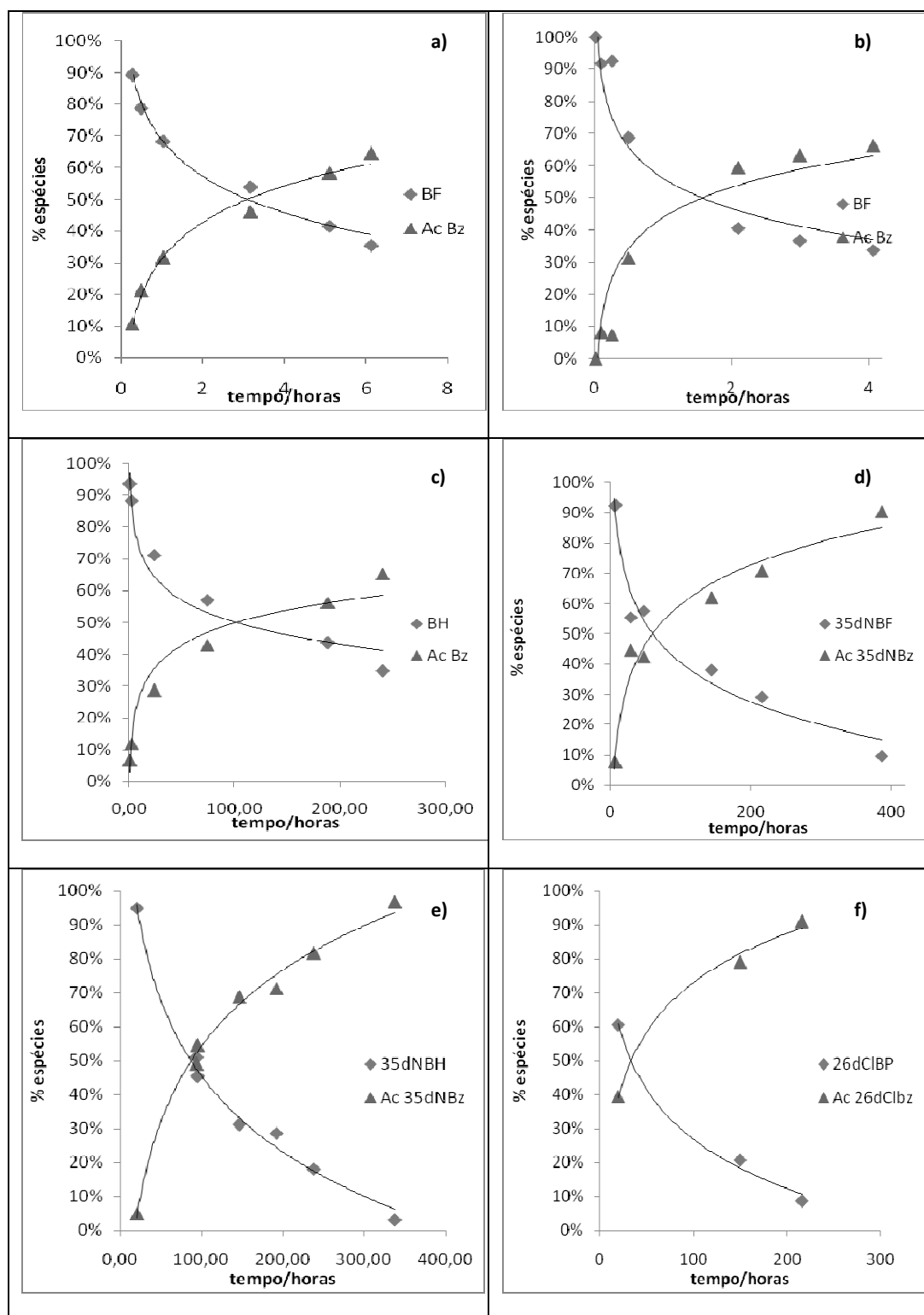


Figura A.IV.1.- Evolução da percentagem de espécies do éster e do ácido ao longo do tempo em tampão fosfato para o composto benzoato de fenilo (BF) em tampão fosfato pH 7,4 (a), pH 5,9 (b); e para os compostos benzoato de hexilo(BH) (c), 3,5-dinitrobenzoato de fenilo(35dNBF) (d), 3,5-dinitrobenzoato de hexilo(35dNBH) (e) e 2,6-diclorobenzoato de propilo(26dClBP)(f) em tampão fosfato pH 7,4.